

**Ein neuer Signalweg  
G<sub>s</sub>-gekoppelter Rezeptoren:  
Aktivierung von Ras und MAP-Kinasen  
durch Epac und Calcium**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

des Fachbereiches

Bio- und Geowissenschaften, Landschaftsarchitektur

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Melanie Leuchter, geb. Keiper

aus Mannheim

Dezember 2004

Die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Untersuchungen wurden am Institut für Pharmakologie des Universitätsklinikums Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. K. H. Jakobs

2. Gutachter: Prof. Dr. H. Esche

3. Gutachter:

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. P. Bayer

Tag der mündlichen Prüfung: 09.03.2005

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>1. VERWENDETE ABKÜRZUNGEN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. EINLEITUNG .....</b>	<b>3</b>
2.1 Phospholipase C- $\epsilon$ : Ein neues Mitglied der PLC-Familie.....	3
2.2 Regulation der PLC- $\epsilon$ durch monomere und heterotrimere GTPasen .....	6
2.3 Regulation der PLC- $\epsilon$ durch Membranrezeptoren .....	11
2.4 Aktivierung von MAP-Kinasen durch G $_s$ -gekoppelte Rezeptoren .....	14
2.5 Zielsetzung der Arbeit.....	16
<b>3. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>18</b>
3.1 Materialien .....	18
3.1.1 Chemikalien, Biochemikalien.....	18
3.1.2 Radioaktive Chemikalien .....	21
3.1.3 Enzyme, Proteine, Puffer.....	22
3.1.4 Plasmide, Oligonukleotide .....	23
3.1.5 Antikörper, Toxine .....	25
3.1.6 Sonstige Verbrauchsmaterialien .....	26
3.2 Geräte.....	27
3.3 Methoden.....	28
3.3.1 Zellkultivierung.....	28
3.3.2 Transfizierung von Zellen .....	29
3.3.3 Zellzählung .....	30
3.3.4 Radioaktive Markierung zellulärer Phospholipide .....	30
3.3.5 Bestimmung der PLC-Aktivität.....	30
3.3.6 Massenbestimmung von IP $_3$ .....	31
3.3.7 B-Raf / Raf-1-Kinase-Aktivität.....	33
3.3.8 Bestimmung von [Ca $^{2+}$ ] $_i$ .....	34
3.3.9 Bestimmung der Rap- bzw- Ras-Aktivierung .....	34
3.3.10 Bestimmung der Aktivierung von EKK1/ERK2.....	36
3.3.11 Immunfällungen .....	37
3.3.12 Kristallviolett-Färbung .....	38
3.3.13 Membranpräparation .....	39
3.3.14 Proteinbestimmungen.....	40

3.3.15	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	40
3.3.16	Immunoblot.....	41
3.4	Molekularbiologische Methoden .....	42
3.4.1	Präparation von gesamtzellulärer RNA und mRNA .....	42
3.4.2	Präparation genomischer DNA .....	43
3.4.3	Reverse Transkription.....	43
3.4.4	Polymerasekettenreaktion .....	44
3.4.5	Ortsgerichtete Mutagenese .....	45
3.4.6	Restriktion von DNA .....	46
3.4.7	Agarosegelelektrophorese von DNA .....	46
3.4.8	Präparation und Reinigung von DNA-Fragmenten .....	47
3.4.9	Ligation von DNA-Fragmenten .....	48
3.4.10	Transformation kompetenter Bakterienzellen .....	48
3.4.11	DNA-Präparation aus Bakterienzellen .....	49
3.4.12	Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen .....	50
3.4.13	DNA-Sequenzierung.....	50
3.4.14	Datenauswertung.....	50
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>51</b>
4.1	Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 durch den $\beta_2$ -Adrenozeptor in HEK-293-Zellen: Basale Parameter.....	51
4.2	Aktivierung von ERK1/2 und H-Ras durch den $\beta_2$ -AR: Rolle von Epac-Proteinen und Rap2B .....	61
4.3	Aktivierung von ERK1/2 und H-Ras durch den $\beta_2$ -AR: Rolle von PLC- $\epsilon$ .....	76
4.4	Aktivierung von ERK1/2 und H-Ras durch den $\beta_2$ -AR: Rolle von $\text{Ca}^{2+}$ .....	87
4.5	Epac- und $\text{Ca}^{2+}$ -kontrollierte Aktivierung von H-Ras und ERK1/2 durch $\text{PGE}_1$ in Neuroblastomzellen .....	96
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>99</b>
<b>6.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>110</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>114</b>
<b>8.</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>123</b>

# 1. Verwendete Abkürzungen

AC	Adenylylcyclase
AR	Adrenozeptor
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BCA	2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>Bovine Serum Albumin</i> )
$[Ca^{2+}]_i$	intrazelluläre $Ca^{2+}$ -Konzentration
cAMP	cyclisches AMP
cDNA	Komplementäre DNA ( <i>copy DNA</i> )
Ci	Curie (1 Ci = $3,7 \cdot 10^{10}$ Bequerel)
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerol
dd-Ado	2',5'-Didesoxyadenosin
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>Enhanced Chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure, Dinatriumsalz
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
ERK	<i>Extracellular Signal-regulated Kinase</i>
FKS	Fetales Kälberserum
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GEF	Guaninnukleotidaustauschfaktor ( <i>Guanine nucleotide Exchange Factor</i> )
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP $\gamma$ S	Guanosin-5'-[ $\gamma$ -thio]triphosphat
HA	<i>Influenza hemagglutinin epitope tag</i>
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HeBS	<i>HEPES-Buffered Saline</i>
HEK-293-Zellen	<i>Human Embryonic Kidney-293-Zellen</i>
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure

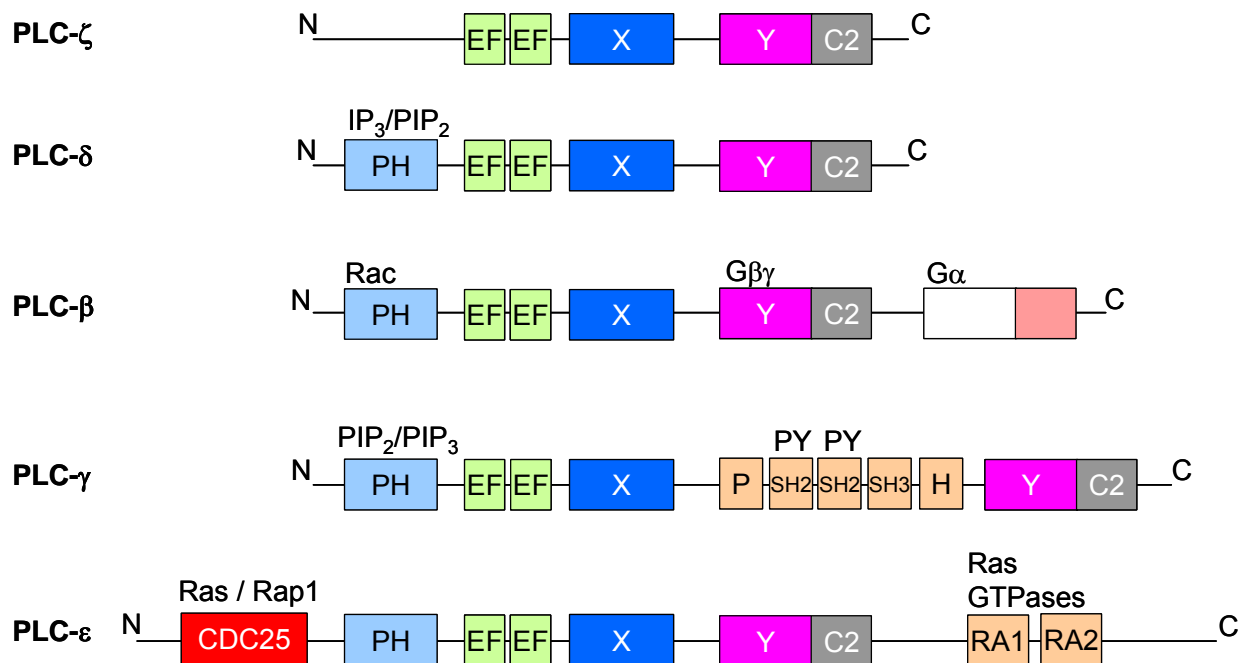
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
LPA	Lysophosphatidsäure
mAChR	muskarinischer Acetylcholin-Rezeptor
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MM	Molekularmasse
MOPS	Morpholinopropan-Sulfonsäure
(m/v)	Masse pro Volumen
OD	Optische Dichte
8-pCPT-2Me-cAMP	8-(4-Chlorophenylthio)-2'-O-Methyl-cAMP
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PGE <sub>1</sub>	Prostaglandin E <sub>1</sub>
PH	<i>Pleckstrin Homology</i>
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PTX	Pertussistoxin
RA	<i>Ras/Rap-Associating domain</i>
RBD	Ras/Rap-Bindungsdomäne
Rp-8-CPT-cAMPS	8-pCPT-adenosine-3',5'-cyclic monophosphorothioate
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SDS	<i>Sodium DodecylSulfate</i>
SH	<i>Src Homology</i>
TBS	<i>Tris-Buffered Saline</i>
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
(v/v)	Volumen pro Volumen

## 2. Einleitung

### 2.1 Phospholipase C- $\epsilon$ : Ein neues Mitglied der PLC-Familie

Die Stimulation der Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>)-spaltenden Phospholipase C (PLC) ist eines der wichtigsten Signalübertragungssysteme in eukaryontischen Zellen, das durch eine Vielzahl von Membranrezeptoren angesteuert wird. Nach Aktivierung dieser Lipasen werden die beiden *second messenger* Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>) gebildet. DAG aktiviert bestimmte Isoformen der Proteinkinase C (PKC) und reguliert darüber viele zelluläre Prozesse, wie u.a. Gentranskription, Zelldifferenzierung und -proliferation (Newton, 2001). IP<sub>3</sub> wiederum bewirkt durch Bindung an spezifische Rezeptoren des sarko/endoplasmatischen Retikulums die Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> aus diesen Speichern, wodurch die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) erhöht wird. Durch das freigesetzte Ca<sup>2+</sup> selbst oder über Ca<sup>2+</sup>-bindende Proteine wie Calmodulin werden verschiedenste Proteine, wie Proteinkinasen, Phospholipasen, NO-Synthasen und Ionenkanäle in ihrer Funktion reguliert (Berridge *et al.*, 2000; Berridge *et al.*, 2003). So führt die Stimulation der PLC zu einer Reihe von Zellantworten wie Muskelkontraktion, Sekretion, Zellwachstum und -differenzierung (Berridge *et al.*, 2000; Battaini, 2001; Berridge *et al.*, 2003).

Bisher wurden 12 PLC-Isoformen identifiziert. Man unterteilt sie in 5 Familien: PLC- $\beta$ 1-4 (130-155 kDa), PLC- $\gamma$ 1/2 (145 kDa), PLC- $\delta$ 1-4 (ca. 85 kDa), PLC- $\epsilon$  (210-255 kDa) und PLC- $\zeta$  (ca. 70 kDa) (Rhee, 2001; Saunders *et al.*, 2002; Schmidt *et al.*, 2004). Gemein sind allen PLC-Isoformen eine katalytische Domäne (bestehend aus den hochkonservierten X- und Y-Domänen) sowie zwei Ca<sup>2+</sup>-bindende Domänen (eine C2-Domäne und *EF-Hands*) für die PLC-Regulation durch Ca<sup>2+</sup>. Zudem weisen alle, bis auf die erst kürzlich entdeckte PLC- $\zeta$  (Saunders *et al.*, 2002), eine *Pleckstrin homology* (PH)-Domäne auf, die vermutlich Membranbindung und Substraterkennung vermittelt. PLC- $\gamma$ -Isoformen besitzen zusätzlich zwischen den katalytischen Regionen eine zweite PH-Domäne sowie *Src homology* (SH) SH2/SH3-Domänen, die tyrosin/prolinreiche Sequenzen erkennen und für die Bindung an Tyrosinkinaserzeptoren und Proteine des Zytoskeletts verantwortlich sind (Schlessinger *et al.*, 2000; Rhee, 2001; Schmidt *et al.*, 2004; Abb. 1).

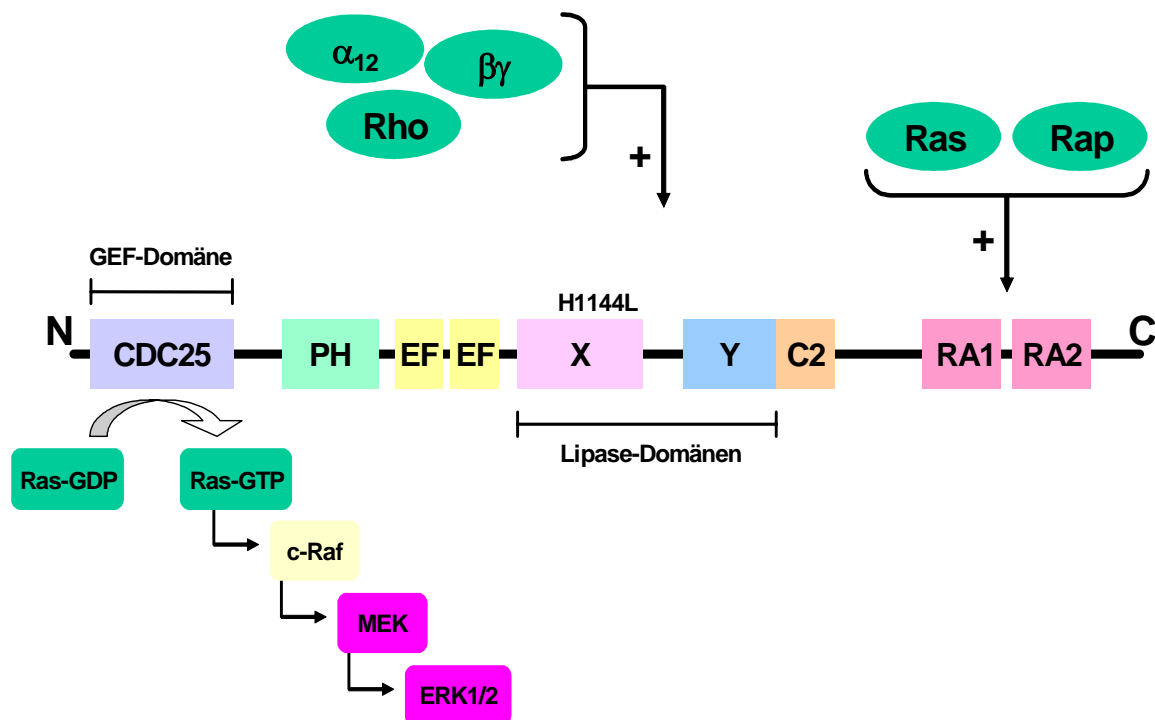


**Abb. 1: Struktur der PLC-Isoformen.** PIP<sub>3</sub>, Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat; PY, Phosphotyrosin. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Die kürzlich identifizierte PLC-ε weist im Vergleich zu den anderen Mitgliedern der PLC-Familie einzigartige strukturelle und regulatorische Charakteristika auf (Rhee, 2001; Wing *et al.*, 2003; Schmidt *et al.*, 2004). Die PLC-ε ist ein Homolog der PLC210 aus *Caenorhabditis elegans*, die mit GTP-gebundenem H-Ras interagieren kann (Shibatoghe *et al.*, 1998). Bislang wurden zwei Splicevarianten der PLC-ε mit Molekulargewichten von ~255 kDa bzw. ~230 kDa identifiziert, die eine besonders hohe Expression in Herz, Niere, Lunge und Gehirn aufweisen (Kelley *et al.*, 2001; Lopez *et al.*, 2001). Die PLC-ε besitzt neben den typischen PLC-definierenden Domänen N-terminal eine CDC25-Domäne mit Guaninnukleotidaustauschfaktor (GEF)-Aktivität für Ras-ähnliche GTPasen sowie C-terminal zwei Ras/Rap-Bindungs- (RA)-Domänen (Abb. 1). Diese Strukturkomponenten ermöglichen somit eine direkte Interaktion der PLC-ε mit Ras-ähnlichen GTPasen sowie eine Modulation Ras-abhängiger Signalwege durch die PLC-ε (Cullen, 2001; Cullen & Lockyer, 2002; Quilliam *et al.*, 2002).



Die PLC- $\epsilon$  ist somit der einzige Vertreter der PLC-Familie mit zwei Enzymaktivitäten: 1) die hochkonservierten X- und Y-Domänen vermitteln die Lipase-aktivität, und 2) die CDC25-Domäne vermittelt die Ras-Familie-spezifische GEF-Aktivität (Abb. 2). In der Tat generiert der Austausch eines hochkonservierten Histidinrestes an der Position 1144 gegen Leucin (H1144L PLC- $\epsilon$ ) in der X-Domäne eine Lipase-inaktive Mutante der PLC- $\epsilon$  (Lopez *et al.*, 2001; siehe unten). Zudem zeigten Kataoka und Kollegen, dass eine Deletion der N-terminalen Aminosäuren 1-1087 (PLC- $\epsilon$   $\Delta$ N, „CDC25-defiziente“ PLC- $\epsilon$ ) die Austauschaktivität der PLC- $\epsilon$  gegenüber der Ras-ähnlichen GTPase Rap1 in COS-7-Zellen komplett unterdrückt (Jin *et al.*, 2001).



**Abb. 2: Struktur und Regulation der PLC- $\epsilon$ .** Weitere Erläuterungen siehe Text.

## 2.2 Regulation der PLC- $\epsilon$ durch monomere und heterotrimere GTPasen

Die Mitglieder der Ras-Familie gehören zur Superfamilie der monomeren GTPasen. Diese Familie umfasst mehr als 100 Mitglieder, die in fünf Familien eingeteilt werden: Ras, Ran, Rab, Rho und ARF. Monomere GTPasen sind im GTP-gebundenen Zustand aktiv und im GDP-gebundenen Zustand inaktiv. Die Aktivierung der monomeren GTPasen wird durch Interaktion mit spezifischen GEFs ermöglicht, während GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) die Hydrolyse von GTP und somit die Inaktivierung der monomeren GTPasen steuern (Hall, 2000; Takai *et al.*, 2001; Quilliam *et al.*, 2002; Bernards & Settleman, 2004). Intensiv wurde die Regulation der Aktivität der PLC- $\epsilon$  durch Ras-ähnliche GTPasen sowie durch GTPasen der Rho-Familie untersucht. Folgende Mitglieder der Ras-Familie wurden hinsichtlich ihrer Bedeutung für die Regulation der PLC- $\epsilon$  näher untersucht: H-Ras, R-Ras, TC21, Ral (RalA, RalB) und Rap (Rap1A, Rap2A, Rap2B) (Jin *et al.*, 2001; Kelley *et al.*, 2001; Lopez *et al.*, 2001; Song *et al.*, 2001; Song *et al.*, 2002; Murphy *et al.*, 2002; Kelley *et al.*, 2004). Aus der Rho-Familie wurden RhoA, RhoB, RhoC, Rac1, Rac2, Rac3 und Cdc42 untersucht (Wing *et al.*, 2003; Seifert *et al.*, 2004; siehe unten).

Initial wurde durch *in vitro*-Untersuchungen und Einsatz des *Yeast two-hybrid* Systems gezeigt, dass die PLC- $\epsilon$  über ihre RA-Domänen an Guanosin-5'-[ $\gamma$ -thio]triphosphat (GTP $\gamma$ S)-beladenes H-Ras ( $K_D \sim 40$  nM) und Rap1A, nicht jedoch an H-Ras-Effektormutanten, R-Ras, RalA, RhoA, Rac1 und Cdc42 bindet. Somit wurde die PLC- $\epsilon$  erstmals als neuer *Downstream*-Effektor von Ras-Proteinen identifiziert (Song *et al.*, 2001). Überraschenderweise hatte die Bindung von Ras-Proteinen an die PLC- $\epsilon$  keinen Einfluss auf die Aktivität der Lipase *in vitro*. Dagegen wurde die intrazelluläre Lokalisation der PLC- $\epsilon$  durch Koexpression von Ras-Proteinen drastisch verändert (siehe unten). Aufbauend auf diesen ersten Ergebnissen zeigten Smrcka und Kollegen, dass die spezifische Bindung von H-Ras an die RA2-Domäne der PLC- $\epsilon$  GTP-abhängig ist, während die Bindung von H-Ras an die RA1-Domäne GTP-unabhängig erfolgt (Kelley *et al.*, 2001). Die RA2-Domäne der PLC- $\epsilon$  wurde zudem durch Einführung von Mutationen spezifischer Aminosäurereste als *bona fide* Ras-Bindungs-Domäne identifiziert. Während eine Koexpression von konstitutiv aktivem Q71L H-Ras und PLC- $\epsilon$  die Aktivität der Lipase in COS-7-Zellen drastisch

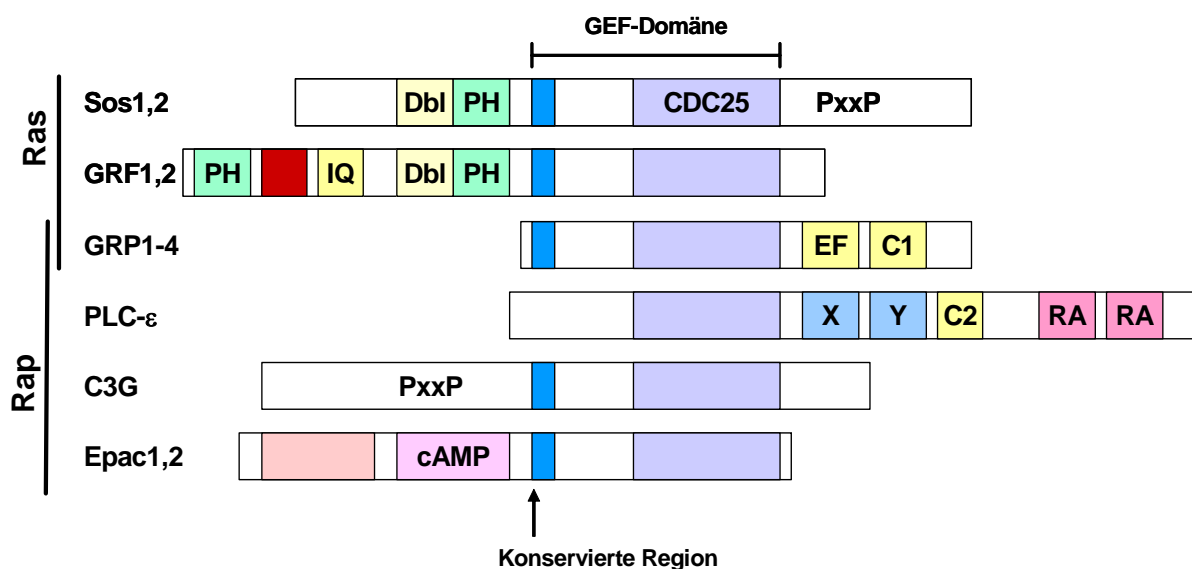
steigerte, hatte GTP $\gamma$ S-beladenes H-Ras keinen Einfluss auf die Aktivität der PLC- $\epsilon$  *in vitro* (Kelley *et al.*, 2001). Somit scheint die Stimulation der PLC- $\epsilon$  durch H-Ras in intakten Zellen möglicherweise weitere Signalkomponenten zu benötigen.

In COS-7-Zellen wurde durch Koexpressionsstudien gezeigt, dass die Translokation der PLC- $\epsilon$  an die Plasmamembran nach Stimulation des Tyrosinkinaserzeptors für den Wachstumsfaktor *Epidermal growth factor* (EGF) Ras-abhängig ist, während die Translokation der PLC- $\epsilon$  an den perinukleären Golgi-Apparat Rap1A-abhängig erfolgt (Song *et al.*, 2001). Somit scheinen Ras und Rap1A eine differentielle Regulation der PLC- $\epsilon$  durch Translokation an verschiedene Zellkompartimente zu ermöglichen. Zudem zeigten Katakoka und Kollegen, dass die PLC- $\epsilon$  über ihre CDC25-Domäne Rap1A, nicht jedoch H-Ras, aktiviert und somit entscheidend zur ihrer persistierenden Translokation an den perinukleären Golgi-Apparat in COS-7-Zellen beiträgt (Jin *et al.*, 2001). Basierend auf diesen Ergebnissen kann man postulieren, dass die PLC- $\epsilon$  über ihre CDC25-Domäne Rap1A aktiviert, d. h. mit GTP belädt, und dass dann GTP-beladenes Rap1A durch Bindung an die RA-Domänen der PLC- $\epsilon$  deren Lipaseaktivität steigert. Dieser Mechanismus kann zu einer Steigerung Rap1-abhängiger Signale, wie u.a. Zellproliferation und -differenzierung sowie Aktivierung von Lymphozyten und Thrombozyten beitragen (Bos *et al.*, 2001; Kinbara *et al.*, 2003).

Überraschenderweise hat die CDC25-Domäne der PLC- $\epsilon$  keinen Einfluss auf die GTP-Beladung und somit Aktivierung von Rap2A und Rap2B. Hingegen wurde gezeigt, dass GTP $\gamma$ S-beladenes Rap2A und Rap2B an die RA-Domänen der PLC- $\epsilon$  binden (Song *et al.*, 2002). Zudem steigerte eine Koexpression von konstitutiv aktivem Rap2B, ähnlich wie konstitutiv aktives H-Ras, TC21 und Rap1A, die Aktivität der PLC- $\epsilon$  in COS-7-Zellen (Murthy *et al.*, 2002; Song *et al.*, 2002). Die PLC- $\epsilon$  aktiviert in TsA201-Zellen jedoch über ihre CDC25-Domäne H-Ras, während die Koexpression von konstitutiv aktivem Ras keinen Einfluss auf die Aktivität der PLC- $\epsilon$  in diesen Zellen ausübte (Lopez *et al.*, 2001). Die Aktivierung von H-Ras durch die PLC- $\epsilon$  *vice versa* die Aktivierung der PLC- $\epsilon$  durch H-Ras ist somit Zelltyp-abhängig. Die Aktivierung der PLC- $\epsilon$  durch Rap1A, Rap2A und Rap2B erfolgt RA-Domänen-abhängig, hingegen aktiviert die CDC25-Domäne der PLC- $\epsilon$  ausschließlich Rap1A, nicht jedoch Rap2A und Rap2B. Diese Ergebnisse implizieren, dass zumindest H-Ras und Rap1 nicht nur *upstream* der PLC- $\epsilon$  lokalisiert sind, also die PLC- $\epsilon$

vermutlich durch Bindung an die RA-Domänen aktivieren, sondern auch *downstream* der PLC- $\epsilon$  lokalisiert sind, also vermutlich durch die PLC- $\epsilon$ -spezifische CDC25-Domäne aktiviert werden (Abb. 1 und 2). Zudem ist anzunehmen, dass die Aktivierung der Ras-ähnlichen GTPasen durch unterschiedliche Austauschfaktoren entscheidend in die Regulation der PLC- $\epsilon$  eingreift.

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Austauschfaktoren identifiziert, die spezifisch die GTP-Beladung von Ras- und Rap-Proteinen katalysieren (Bos *et al.*, 2001; Cullen & Lockyer, 2002; Quilliam *et al.*, 2002; Springett *et al.*, 2004). Gemein sind diesen Austauschfaktoren eine hochkonservierte CDC25-Domäne, die Spezifität für Ras- und Rap-Proteine aufweist. Die PLC- $\epsilon$  ist somit ein Mitglied dieser Familie (Abb. 3).



**Abb. 3: Austauschfaktoren für Mitglieder der Ras-Familie.** PxxP, Prolinreiche Sequenz. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Klassische Vertreter dieser Familie sind Sos und C3G. Während Sos (Sos1 und Sos2) Ras aktivieren, stellt C3G das erste Rap-spezifische GEF dar. Sos und C3G weisen prolinreiche Sequenzen auf, die durch die SH3-Domänen der Adaptorproteine Grb2 und Crk erkannt werden und schließlich in die Aktivierung von Ras bzw. Rap münden. Die GEF-Aktivitäten der GRF-Proteine (GRF1 und GRF2,

*Guanine nucleotide Releasing Factor*) und der GRP-Proteine (GRP1 – GRP4, *Guanine nucleotide Releasing Protein*) werden durch die *second messenger*  $\text{Ca}^{2+}$  und DAG reguliert. Die GRFs besitzen N-terminal eine *Ilimaquinone* (IQ)-Domäne; diese vermittelt durch Bindung von Calmodulin die  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität der GRFs (Cullen & Lockyer, 2002; Quilliam *et al.*, 2002). Dagegen weisen die GRPs neben den GEF-definierenden Domänen C-terminal eine *EF-Hand* und eine C1-Domäne auf, die  $\text{Ca}^{2+}$  und DAG binden. Ähnlich wie die GRFs aktivieren RasGRP1 und RasGRP4 nur Ras-Proteine, während RasGRP2 Rap-Proteine aktiviert und RasGRP3 sowohl Ras- als auch Rap-Proteine aktivieren kann (Bos *et al.*, 2001; Cullen & Lockyer, 2002; Quilliam *et al.*, 2002; Springett *et al.*, 2004).

Kürzlich wurden mit den Epac-Proteinen (Epac1 und Epac2, *Exchange Protein Activated by cAMP*) neue Rap-spezifische Austauschfaktoren identifiziert. Interessanterweise werden Epac-Proteine direkt durch den *second messenger* cAMP (cyclisches AMP), unabhängig von der Proteinkinase A (PKA), aktiviert und können somit als neue cAMP-Effektoren angesehen werden (de Rooij *et al.*, 1998; Kawasaki *et al.*, 1998; Bos, 2003; Kopperud *et al.*, 2003; Springett *et al.*, 2004). Der *second messenger* cAMP wird durch die Adenylylcyclase (AC)-Familie gebildet, die neben der PLC das zweite bedeutsame Signaltransduktionssystem aller eukaryontischen Zellen bildet (Hanoune & Defer, 2001; Beavo & Brunton, 2002). Kürzlich wurde ein neues cAMP-Analog [8-(4-Chlorophenylthio)-2'-O-Methyl-cAMP, 8-pCPT-2Me-cAMP] beschrieben. Dieses membrangängige cAMP-Analog aktiviert spezifisch Epac-Proteine, aber nicht die PKA, während andere cAMP-Derivate die PKA, aber nicht Epac-Proteine aktivieren (Enserink *et al.*, 2002; Abb. 4). Der Einsatz dieser cAMP-Analoga lässt zukünftig eine differentielle Betrachtung von PKA- und Epac-abhängigen Signalwegen erwarten.

Die Aktivität von monomeren GTPasen wird nicht nur engmaschig durch deren Interaktion mit spezifischen GEFs reguliert, sondern auch durch GAPs (Bernards & Settleman, 2004; Ohba, 2003). Die GAP-Familie wird in 5 Untergruppen eingeteilt: RasGAPs, RapGAPs, RhoGAPs, ARFGAPs und RabGAPs. Während GAP1<sup>1P4BP</sup> ein Ras-spezifisches GAP-Protein darstellt, ist RapGAPII Rap-spezifisch (Cullen & Lockyer, 2002; de Bruyn *et al.*, 2002). Die Aktivität der GAP-Proteine wird mannigfaltig durch Protein-Protein- und Protein-Phospholipid-Interaktionen, die durch SH3- und PH-Domänen vermittelt werden, moduliert. Zudem scheinen Phosphorylierungen durch PKA und  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulinabhängige Proteinkinasen, die

nachfolgend zu einer veränderten intrazellulären Lokalisation der GAPs führen, sowie der Abbau von GAP-Proteinen durch kontrollierte Proteolyse von Bedeutung zu sein. Die Ausschaltung der RasGAP-Aktivität scheint mit einem gesteigerten Krebsrisiko zu korrelieren (Bernards & Settleman, 2004).

Die PLC- $\epsilon$  besitzt ähnlich wie die PLC- $\beta$ -Isoformen eine regulatorische C-terminale *Coiled-coil*-Domäne. Eine Interaktion GTP-beladener  $\alpha$ -Untereinheiten der  $G_q$ -Familie heterotrimerer G-Proteine mit dieser Domäne aktiviert Isoformen der PLC- $\beta$  ( $\beta_1 = \beta_4 \geq \beta_3 > \beta_2$ ) (Rhee, 2001; Schmidt *et al.*, 2004). Heterotrimere G-Proteine werden in vier Familien eingeteilt:  $G_s$ ,  $G_i$ ,  $G_q$  und  $G_{12}$ . Während  $G_s$ -Proteine die Aktivität der AC stimulieren, inhibieren Pertussistoxin (PTX)-sensitive  $G_i$ -Proteine die AC (Hall, 2000; Hanoune & Defer, 2001; Beavo & Brunton, 2002). Heterotrimere G-Proteine bestehen aus drei Untereinheiten: einer  $\alpha$ -Untereinheit, die GDP und GTP bindet sowie GTP zu GDP hydrolysiert, und einem  $\beta\gamma$ -Dimer. Durch Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren erfolgt die GTP-Beladung, d.h. Aktivierung der  $\alpha$ -Untereinheit und die Dissoziation GTP-gebundener  $\alpha$ -Untereinheiten vom  $\beta\gamma$ -Dimer. Sowohl die GTP-gebundene  $\alpha$ -Untereinheit als auch  $\beta\gamma$ -Dimere können mit verschiedenen Effektoren interagieren (Hall, 2000; Lefkowitz, 2000; Marinissen & Gutkind, 2001). So ist bekannt, dass aus  $G_i$ -Proteinen freigesetzte  $\beta\gamma$ -Dimere Isoformen der PLC- $\beta$  ( $\beta_2 > \beta_3 > \beta_1$ , nicht jedoch  $\beta_4$ ) aktivieren können (Rhee, 2001; Schmidt *et al.*, 2004).

Durch Koexpressionsstudien mit konstitutiv aktiven Mutanten der  $\alpha$ -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine wurde gezeigt, dass  $G_{\alpha_{12}}$  und  $G_{\alpha_{13}}$ , nicht jedoch  $G_{\alpha_q}$ ,  $G_{\alpha_s}$  und  $G_{\alpha_i}$  die Aktivität der PLC- $\epsilon$  drastisch steigern können (Lopez *et al.*, 2001; Wing *et al.*, 2001; Kelley *et al.*, 2004). Zudem zeigten Harden und Kollegen, dass auch die Koexpression von  $\beta\gamma$ -Dimeren die Aktivität der PLC- $\epsilon$  positiv beeinflusst (Wing *et al.*, 2001). Die Stimulation der PLC- $\epsilon$  durch  $\beta\gamma$ -Dimere wurde durch eine Koexpression mit  $G_{\alpha_{12}}$  nicht gesteigert. Ebenso wurde gezeigt, dass der stimulatorische Effekt der  $\beta\gamma$ -Dimere RA2-Domänen-unabhängig, somit Ras-unabhängig erfolgt (Wing *et al.*, 2001).

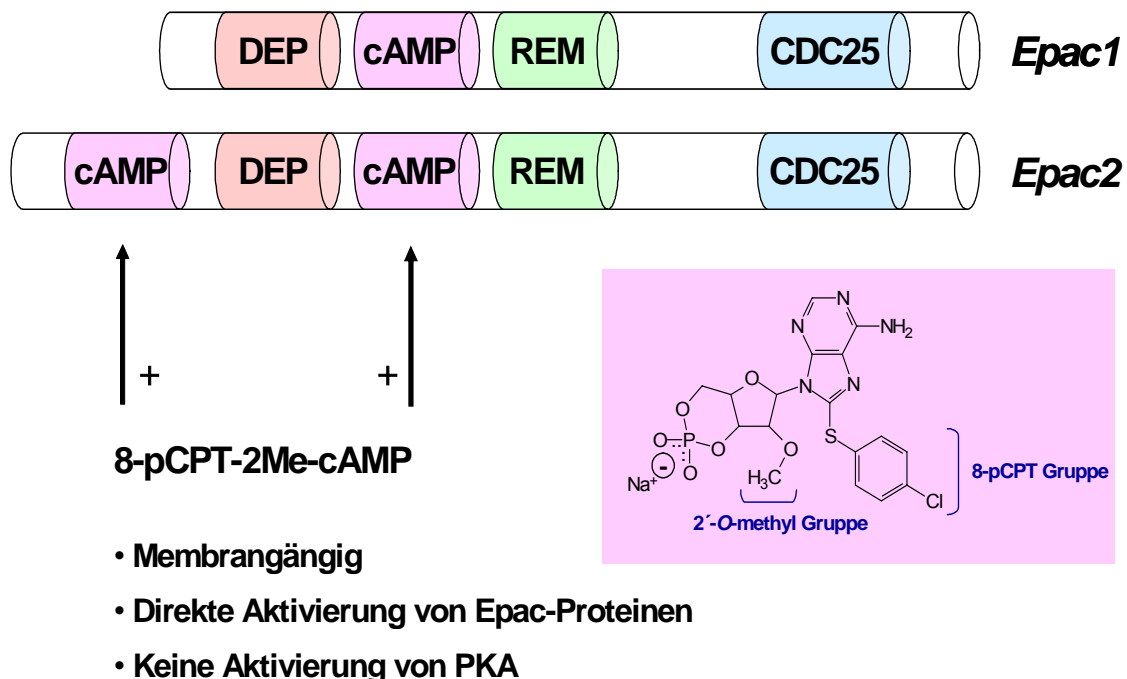
Proteine der  $G_{12}$ -Familie regulieren u.a. Zellproliferation und -differenzierung (Gutkind, 1998; Hall, 2000). Häufig werden diese Zellantworten durch eine Aktivierung von GTPasen der Rho-Familie durch  $G_{12}$ -Proteine vermittelt (Schmidt & Hall, 2002). Die Mitglieder der Rho-Familie (Rho, Rac, Cdc42) regulieren nicht nur maßgeblich die Struktur des Aktin-Zytoskeletts, sondern auch viele andere

Zellantworten, wie Sekretion, Kontraktion glatter Muskelzellen, Migration und Gentranskription (Schmitz *et al.*, 2000; Etienne-Manneville & Hall, 2002). Daher konnte man sich eine Beteiligung von Rho-GTPasen bei der Stimulation der PLC- $\epsilon$  durch G<sub>12</sub>-Proteine vorstellen. In der Tat wurde gezeigt, dass Koexpression von konstitutiv aktiven RhoA, RhoB und RhoC die Aktivität der PLC- $\epsilon$  deutlich steigert; konstitutiv aktives Rac1, Rac2, Rac3 und Cdc42 übten jedoch nahezu keinen Effekt aus (Wing *et al.*, 2003; Kelley *et al.*, 2004). Dagegen werden Isoformen der PLC- $\beta$  ( $\beta_2 > \beta_3 > \beta_1$ ) durch Rac und Cdc42, nicht jedoch durch Rho, vermutlich über eine Interaktion mit der PH-Domäne aktiviert (Schmidt *et al.*, 2004). Aufbauend auf diesen initialen Experimenten zeigten Harden und Kollegen kürzlich erstmals, dass RhoA die PLC- $\epsilon$  *in vitro* aktiviert (Seifert *et al.*, 2004). Eine Vielzahl von Signalmolekülen, inkl. der Ras-ähnlichen GTPasen (H-Ras, Rap1A, Rap2B), stimuliert die Aktivität der PLC- $\epsilon$  jedoch nicht direkt. Eher ist anzunehmen, dass durch diese Signalmoleküle die PLC- $\epsilon$  an Membranen, z.B. Plasmamembranen transloziert wird, wo sie dann an ihr Substrat PIP<sub>2</sub> bindet und hydrolysiert.

### 2.3 Regulation der PLC- $\epsilon$ durch Membranrezeptoren

Die Regulation der PLC- $\epsilon$  durch Membranrezeptoren ist noch in weiten Teilen unklar und momentan Gegenstand intensiver Forschungsaktivitäten. Die stimulatorischen Effekte von  $\alpha$ -Untereinheiten der G<sub>12</sub>-Familie und der G $\beta\gamma$ -Dimere legten eine Regulation der PLC- $\epsilon$  durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren nahe. In der Tat konnte unsere Arbeitsgruppe erstmals zeigen, dass G-Protein-gekoppelte Rezeptoren die PLC- $\epsilon$  stimulieren können (Schmidt *et al.*, 2001). Hierbei handelte es sich um G<sub>s</sub>-gekoppelte Rezeptoren, nämlich den  $\beta_2$ -Adrenorezeptor (transiente Expression in HEK-293-Zellen) und den Rezeptor für das Prostaglandin E<sub>1</sub> (PGE<sub>1</sub>) (endogene Expression in N1E-115-Neuroblastomzellen). Diese Rezeptoren aktivieren primär über G<sub>s</sub> die AC und führen somit zur Bildung von cAMP. Überraschenderweise wurde die Stimulation der PLC- $\epsilon$  durch diese Rezeptoren nicht durch den primären cAMP-Effektor PKA, sondern durch Epac-Proteine weitergeleitet, die über eine Aktivierung, d.h. GTP-Beladung von Rap2B (nicht jedoch H-Ras, Rap1A und Rap1B) zur Stimulation der PLC- $\epsilon$  führten (Schmidt *et al.*, 2001). Aufbauend auf diesen Ergebnissen zeigte unsere Arbeitsgruppe, dass auch die Stimulation der PLC- $\epsilon$  durch den M<sub>3</sub> Muskarinrezeptor durch Kopplung des

Rezeptors an  $G_s$ , Epac1 und Rap2B erfolgt (Evellin *et al.*, 2002). Im Einklang mit diesen Ergebnissen zeigte sich, dass typische  $G_i$ -Protein-gekoppelte Rezeptoren, wie der  $M_2$  Muskarinrezeptor und der  $\delta$ -Opioidrezeptor, vermutlich durch Hemmung der AC, zu einer Reduktion der PLC- $\epsilon$ -Stimulation durch  $G_s$ -Protein-gekoppelte Rezeptoren führen (vom Dorp *et al.*, 2004). Somit scheinen Epac-Proteine als zelluläre cAMP-Sensoren eine Feinmodulation der Regulation der PLC- $\epsilon$  durch typische  $G_s$ - und  $G_i$ -gekoppelte Rezeptoren zu ermöglichen. In der Tat initiierte eine direkte Aktivierung von Epac-Proteinen durch das Epac-spezifischen cAMP-Analog 8-pCPT-2Me-cAMP die Stimulation der PLC- $\epsilon$  durch  $G_s$ -gekoppelte Rezeptoren (vom Dorp *et al.*, 2004, Abb. 4).



**Abb. 4: Epac-Proteine und 8-pCPT-2Me-cAMP.** DEP, *Dishevelled/Egl-10/Pleckstrin*-Domäne (Membranassoziation); REM, *Ras exchange motif*. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Smrcka und Kollegen zeigten kürzlich, dass Lysophosphatid-, Sphingosin-1-Phosphat- und Thrombinrezeptoren die PLC- $\epsilon$  RA2-Domänen-unabhängig über  $G_{12}$ - und  $G_i$ -Proteine und RA2-Domänen-abhängig über Rap-Proteine stimulieren (Kelley *et al.*, 2004). Die genauen Mechanismen der Kopplung dieser G-Protein-gekoppelten



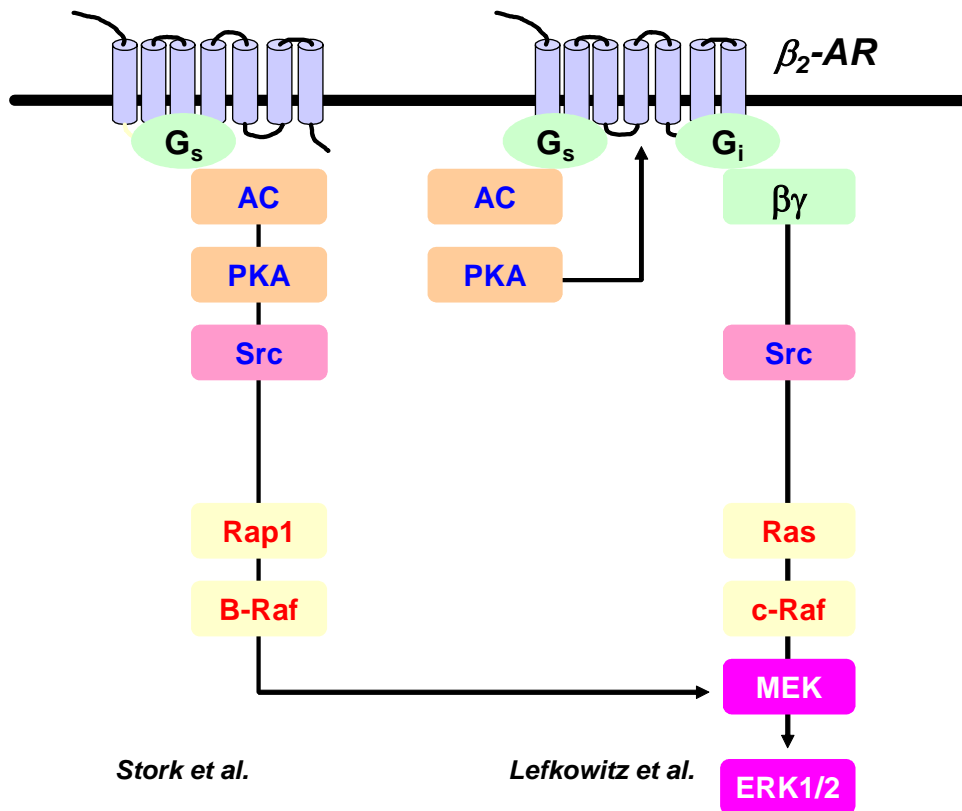
Rezeptoren an die PLC- $\epsilon$ , insbesondere hinsichtlich der Beteiligung Rap-spezifischer Austauschfaktoren wurden jedoch nicht untersucht. Insgesamt zeigen die bisherigen Ergebnisse jedoch, dass die PLC- $\epsilon$  durch verschiedene Membranrezeptoren aus der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren stimuliert werden kann.

Die PLC- $\epsilon$  wird nicht nur durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, sondern auch durch Tyrosinkinaserzeptoren stimuliert. Kataoka und Kollegen zeigten kürzlich, dass eine PLC- $\gamma$ 1-Kopplungsdefiziente Mutante des Tyrosinkinaserektors für den Wachstumsfaktor *Platelet-derived growth factor* (PDGF) die PLC- $\epsilon$  in BaF3-Zellen Ras- und Rap1A-abhängig stimuliert (Song *et al.*, 2002). Interessanterweise scheint Ras eine transiente Stimulation der PLC- $\epsilon$  zu vermitteln, während Rap1A eine langandauernde Stimulation der Lipase ermöglicht. Diese differentielle Regulation der PLC- $\epsilon$  durch Ras und Rap1A ist von wesentlicher Bedeutung für die Proliferation der BaF3-Zellen (Song *et al.*, 2002). Die Regulation der PLC- $\epsilon$  durch Tyrosinkinaserzeptoren ist nicht auf den PDGF-Rezeptor beschränkt. So wurde gezeigt, dass der EGF-Rezeptor die PLC- $\epsilon$  in COS7-Zellen RA2-Domänen-abhängig durch Ras- und Rap-Proteine stimuliert (Kelley *et al.*, 2004). In unserer Arbeitsgruppe wurde die Regulation der PLC- $\epsilon$  durch den EGF-Rezeptor näher charakterisiert. In HEK-293-Zellen aktivierte der EGF-Rezeptor die PLC- $\epsilon$  unter Vermittlung des  $\text{Ca}^{2+}$ /DAG-regulierten GRP3 (RasGRP3), welches zum einen durch eine PLC- $\gamma$ 1-abhängige  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Erhöhung und zum anderen durch eine Tyrosinphosphorylierung durch die zytosolische Tyrosinkinase c-Src aktiviert wird und schliesslich in eine Aktivierung von Rap2B mündet (Stope *et al.*, 2004). Interessanterweise induzierte der aktivierte EGF-Rezeptor sowie die Expression von konstitutiv aktivem Rap2B eine Translokation der PLC- $\epsilon$  an die Plasmamembran dieser Zellen. Diese Umverteilung der PLC- $\epsilon$  wurde durch Expression einer dominant negativen Rap2B Mutante komplett unterdrückt (Stope *et al.*, 2004). Insgesamt zeigen die bisher publizierten Daten, dass die PLC- $\epsilon$  einer Kontrolle verschiedener Membranrezeptoren unterliegt, die über unterschiedliche monomere GTPasen und spezifische Austauschfaktoren ermöglicht wird.

## 2.4 Aktivierung von MAP-Kinasen durch G<sub>s</sub>-gekoppelte Rezeptoren

Wie oben erwähnt, ist die PLC- $\epsilon$  anscheinend von entscheidender Bedeutung für die Regulation der Proliferation von BaF3-Zellen durch Ras und Rap1A (Song *et al.*, 2002). Zudem zeigten Lomasney und Kollegen, dass die PLC- $\epsilon$  über Ras und nachfolgende Aktivierung der Raf-1-Kinase die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen) ERK1 und ERK2 (*extracellular signal-regulated kinase*) stimulieren kann (Lopez *et al.*, 2001). Auch Kataoka und Mitarbeiter zeigten, dass die PLC- $\epsilon$  zur Aktivierung von ERK1/2 führen kann, jedoch erfolgte hier die Aktivierung über Rap1A und B-Raf (Jin *et al.*, 2001). Bisher gibt es keine Ergebnisse hinsichtlich einer Beteiligung der PLC- $\epsilon$  bei der Aktivierung von MAP-Kinasen durch Rezeptoren.

In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass neben Tyrosinkinase-Rezeptoren auch eine große Zahl von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren die MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 aktivieren und darüber wesentliche zelluläre Prozesse wie Zellwachstum und -differenzierung regulieren (Gutkind, 2000; Pearson *et al.*, 2001; Johnson & Lapadat, 2002). Einen besonderen Status nehmen hier die G<sub>s</sub>-gekoppelten Rezeptoren ein. Diese Rezeptoren, die primär über G<sub>s</sub>-Proteine die AC stimulieren und darüber die intrazelluläre cAMP-Konzentration erhöhen, hemmen in vielen Zellen die ERK-Aktivierung durch Wachstumsfaktoren. Dagegen findet besonders in neuronalen und endokrinen Zellen häufig eine ERK-Aktivierung durch diese Rezeptoren statt. Diese gegenläufigen Effekte von G<sub>s</sub>-gekoppelten Rezeptoren scheinen im Wesentlichen durch die PKA vermittelt zu werden (Richards, 2001; Stork & Schmitt, 2002).



**Abb. 5: Modelle der Aktivierung von ERK1/2 durch den  $\beta_2$ -Adrenozeptor.** Weitere Erläuterungen siehe Text.

Die Mechanismen der ERK-Aktivierung durch  $G_s$ -gekoppelte Rezeptoren wurden in den letzten Jahren intensiv untersucht. Als Modellsystem wurde hierbei insbesondere die Aktivierung von ERK1/2 durch den  $\beta_2$ -Adrenozeptor in HEK-293-Zellen untersucht. Lefkowitz und Mitarbeiter zeigten, dass eine Aktivierung der PKA durch cAMP, dessen Bildung durch den Rezeptor initiiert wurde, zu einer Phosphorylierung des  $\beta_2$ -Adrenozeptors führt, wodurch der Rezeptor seine Kopplungspräferenz von  $G_s$ - zu  $G_i$ -Proteine ändert (Daaka *et al.*, 1997). Aus den aktivierten  $G_i$ -Proteinen werden nachfolgend  $G\beta\gamma$ -Dimere freigesetzt, die dann über die zytosolische Tyrosinkinase c-Src H-Ras aktivieren, das dann schließlich die MAP-Kinase-Kinase-Kinase Raf-1 aktiviert (Daaka *et al.*, 1997; Lefkowitz *et al.*, 2002) (Abb. 5). Weiterführende Experimente zeigten, dass das *Switching* von  $G_s$ - zu  $G_i$ -Proteinen durch eine  $\beta$ -Arrestin-abhängige Translokation der Phosphodiesterase 4 an die Plasmamembran und damit Modulation der PKA-Aktivität kontrolliert wird (Baillie *et al.*, 2003). Dagegen zeigten Stork und Schmitt, dass die Aktivierung von ERK1/2 durch den  $\beta_2$ -Adrenozeptor in HEK-293-Zellen zwar auch PKA- und c-Src-

abhängig ist, jedoch nicht über  $G_i$ -Proteine abläuft (Schmitt & Stork, 2000). Weiterhin zeigten sie, dass die Aktivierung von ERK1/2 durch den  $\beta_2$ -Adrenozeptor anscheinend nicht über Ras, sondern über die verwandte GTPase Rap1 verläuft, die dann die MAP-Kinase-Kinase-Kinase B-Raf aktivieren soll (Abb. 5). Die Autoren zeigten zudem, dass die Aktivierung von Rap1A durch den  $\beta_2$ -Adrenozeptor über eine Phosphorylierung von C-Src (am Serinrest 17) durch die PKA abläuft. Der Rezeptor führt auch über  $G\beta\gamma$ -Dimere und c-Src zur Aktivierung von Ras, was jedoch nicht zur ERK-Aktivierung führen soll (Schmitt & Stork, 2002a). Schließlich zeigten die Autoren, dass über PKA, c-Src und C3G aktiviertes Rap1 auch an Raf-1 bindet, dieses jedoch anscheinend nicht aktiviert und damit Raf-1 der Aktivierung durch Ras entzieht, so dass die Ras-abhängige ERK-Aktivierung gehemmt ist (Schmitt und Stork, 2002b). Die beiden Arbeitsgruppen postulieren also eine differentielle und weitestgehend unabhängige Regulation von Raf-1 (durch H-Ras) und B-Raf (durch Rap1A). Hingegen zeigten Marais und Kollegen kürzlich, dass in Gegenwart von inaktiven B-Raf-Mutanten eine ERK-Aktivierung, vermutlich vermittelt über Raf-1 erfolgt. Die Arbeitsgruppe mutmaßt, dass die inaktiven B-Raf-Mutanten eine aktive Konformation von Raf-1 stabilisieren und dieser Effekt schließlich in eine Raf-1- und ERK-Aktivierung mündet (Morrison, 2004; Wan *et al.*, 2004). Ob dieser Effekt eine Bedeutung für die ERK-Regulation durch den  $\beta_2$ -Adrenozeptor hat, ist unklar. Insgesamt gibt es also zwei sehr unterschiedliche Signalwege, die die Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2 durch den  $\beta_2$ -Adrenozeptor erklären (Abb. 5).

## 2.5 Zielsetzung der Arbeit

Das primäre Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu prüfen, ob es neben den etablierten Modellen der ERK-Aktivierung durch  $G_s$ -gekoppelte Rezeptoren (Stork & Schmitt, 2002; Lefkowitz *et al.*, 2002; Abb. 5) weitere Wege gibt, wie diese cAMP-generierenden Rezeptoren die MAP-Kinasen aktivieren. Ganz spezifisch sollte untersucht werden, ob die PLC- $\epsilon$  bei dieser Aktivierung beteiligt ist. Basierend auf den früheren Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe wurden die Untersuchungen in HEK-293-Zellen, die transient den  $\beta_2$ -Adrenozeptor exprimierten, und in N1E-15-Neuroblastomzellen, die endogen einen Rezeptor für  $PGE_1$  exprimieren, durchgeführt. Für beide Rezeptoren und Zellsysteme war gezeigt worden, dass Aktivierung dieser Rezeptoren zur Stimulation der PLC- $\epsilon$  führt. Wie oben erwähnt,

erfolgt diese Aktivierung der PLC- $\epsilon$  durch die beiden G<sub>s</sub>-gekoppelten Rezeptoren nicht über die PKA, sondern über Epac-Proteine. Falls eine MAP-Kinase-Aktivierung durch die G<sub>s</sub>-gekoppelten Rezeptoren unter Einschaltung von Epac und PLC- $\epsilon$  darstellbar wäre, sollte dieser neue Signalweg auf molekularen Ebene näher charakterisiert werden, insbesondere hinsichtlich der Fragen, welche GTPasen und welche Austaschfaktoren sind hierbei eingeschaltet und ob die PLC- $\epsilon$  über ihre Ras/Rap-GEF-Aktivität oder ihre Lipaseaktivität zur Aktivierung der MAP-Kinasen beiträgt.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Chemikalien, Biochemikalien

<u>Name</u>	<u>Hersteller/Lieferfirma</u>
2'5'-Dideoxyadenosin (dd-Ado)	Calbiochem
8-pCPT-2Me-cAMP	Biolog
Acrylamid	Serva
ATP	Roche
Adrenalin	Sigma
Agarose, Ultra Pure	Invitrogen
Ameisensäure	Merck
Ammoniumformiat	Fluka
Ammoniumpersulfat	Serva
Ampicillin	Grünenthal
Aprotinin	Sigma
BAPTA/AM	Calbiochem
Benzamidin	Sigma
Bisacrylamid	Serva
$\beta$ -Glycerolphosphat	Fluka
$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck
Borsäure	Merck
Bradykinin	Sigma
Bromphenolblau	Fluka
BSA	Biomol
BSA, fettfrei	Sigma
Calciumchlorid	Merck
Calmidazolium	Calbiochem
Carbachol	Sigma
Chloroform	Baker
Chloroquin	Sigma
Coomassie-Blau	Serva
D(+)-Glukose	Merck
DEPC	Sigma

Diethylether	Merck
Digitonin	Sigma
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck
Dithiothreitol	Serva
DMEM/F-12	Invitrogen
Inositolfreies DMEM	Invitrogen
DMSO	Sigma
dNTP-Mix	Roche
ECL-Immunoblot-Reagenz	Amersham
ECL-Immunoblot-Reagenz, <i>Enhanced</i>	Amersham
EDTA	Merck
EGF	Biomol
EGTA	Merck
Essigsäure (96%)	Baker
Ethanol	Baker
Ethidiumbromid	Roth
FKS	Invitrogen
Fluphenazin	Calbiochem
Forskolin	Calbiochem
Fura-2/AM	Molecular Probes
Gene Ruler™ 50 bp DNA Ladder	Fermentas
Gene Ruler™ 1kB DNA Ladder	Fermentas
Geneticin (G418)	Invitrogen
Glutathion-Sepharose-Beads	Pharmacia
Glycerin	Fluka
Glycin	Sigma
Gö 6976	Calbiochem
H-89	Calbiochem
HEPES	Serva
IP <sub>3</sub>	Sigma
IPTG	Stratagene
Isopropanol	Baker
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck

Kristallviolett	Merck
L-Arginin	Invitrogen
LB-Agar	Invitrogen
LB-Medium	Invitrogen
L-Cystein	Invitrogen
Leupeptin-Hemisulfat	Sigma
L-Glutamin	Invitrogen
Lithiumchlorid	Merck
L-Leucin	Invitrogen
L-Methionin	Invitrogen
Loading Dye Solution 6x	Fermentas
LY294002	Sigma
Lysophosphatidsäure	Sigma
Magermilchpulver	Merck
Magnesiumchlorid	Merck
MEK-1, unphosphoryliert	Upstate Biotechnology
Methanol	Baker
Molekulargewichtstandards für Proteine	Sigma
MOPS	Serva
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumdesoxycholat	Sigma
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Natriumfluorid	Sigma
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Natriumhydroxid	Merck
Natriumorthovanadat	Merck
Natriumpyrophosphat	Sigma
Neomycin	Sigma
Nonidet P40	Fluka
Ophiobolin A	Calbiochem
PD98059	Calbiochem
PDGF	TEBU
Penicillin/Streptomycin	Seromed



PGE <sub>1</sub>	Calbiochem
Phenol, TE gesättigt	Roth
Phenylendiamin	Sigma
Phenylmethylsulfonylfluorid	Roche Molecular Biochemicals
Phosphorsäure	Merck
Poly-L-Lysin (>300.000 Da)	Seromed
Ponceau S	Sigma
PP2	Calbiochem
Propranolol	Sigma
Protein-A-Agarose	Santa Cruz
Proteinstandard (Rinder-γ-Globulin)	Biorad
Rotiblock	Roth
RP-8-CPT-cAMPS	Biolog
Saccharose	Merck
Salzsäure (37%)	Merck
SDS	Serva
Serva-Blau (G und R)	Serva
S.O.C.-Medium	Invitrogen
Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor	Sigma
TEMED	Serva
Trichloressigsäure	Merck
Triethanolamin	Merck
Tris-HCl	Merck
Triton X-100	Roth
Trypan-Blau 0,4%	Sigma
Tween 20	Sigma
U0126	Calbiochem
W7	Calbiochem

### 3.1.2 Radioaktive Chemikalien

<u>Name (spezifische Aktivität)</u>	<u>Hersteller/Lieferfirma</u>
[γ- <sup>32</sup> P]ATP (3000 Ci/mmol)	PerkinElmer Life Sciences
myo-[ <sup>3</sup> H]Inositol (18 Ci/mmol)	PerkinElmer Life Sciences
[ <sup>3</sup> H]IP <sub>3</sub> (21 Ci/mmol)	PerkinElmer Life Sciences

### 3.1.3 Enzyme, Proteine, Puffer

#### 3.1.3.1 Enzyme

<u>Enzyme</u>	<u>Hersteller/Lieferfirma</u>
<i>Dpn</i> I	Fermentas
Expand High Fidelity Polymerase	Roche
<i>Kpn</i> I	Invitrogen
<i>Nde</i> I	New England Biolabs
<i>Not</i> I	Fermentas
<i>Pfu</i> Turbo Polymerase	Stratagene
<i>Sal</i> I	Fermentas
<i>Stu</i> I	Invitrogen
<i>Superscript</i> II Reverse Transkriptase	Invitrogen
T4-DNA-Ligase	Promega
<i>Xba</i> I	Invitrogen

#### 3.1.3.2 Proteine

<u>Proteine</u>	
RNAasin	Promega

#### 3.1.3.3 Puffer

<u>Puffer</u>	
Erststrangpuffer	Promega
Expand High Fidelity Puffer	Roche
Ligasepuffer	Promega
NEB 4	New England Biolabs
<i>Pfu</i> -Puffer	Stratagene
Puffer 0 <sup>+</sup>	Fermentas
REact 1	Gibco BRL

### 3.1.4 Plasmide, Oligonukleotide

#### 3.1.4.1 Sequenzen

Epac1	Accession Number AF103905
h-PLC- $\varepsilon$	Accession Number AF1700711
RasGRP1	Accession Number NT_010194
RasGRP2	Accession Number NT_033903
RasGRP3	Accession Number NT_022184

#### 3.1.4.2 Oligonukleotide (Invitrogen)

<u>Name</u>	<u>Sequenz</u>	<u>Einsatz</u>
A280G Seq1	5'-gggaccgtgtgttcagc-3'	Sequenzierung
A280G Seq2	5'-ggctctctccagcaccag-3'	Sequenzierung
GRP1 FOR	5'-actaacaacttcaaagccaccagtag-3'	PCR
GRP1 REV	5'-tcctgagaaatgtatccatcctggtc-3'	PCR
GRP2 FOR	5'-gaagcggcaggtgactcagcggaac-3'	PCR
GRP2 REV	5'-agagggagatgaaccgctccaggac-3'	PCR
GRP3 FOR	5'-gtggagccaattgtcacaacagtg-3'	PCR
GRP3 REV	5'-gcctgtaaccagtgtgatggctctg-3'	PCR
Epac420 REV	5'-gtagaattgggcatctcggtc-3'	Sequenzierung
Epac1400 FOR	5'-agcagtggccagagaggcg-3'	Sequenzierung
Epac2100 FOR	5'-ggcccacctaaggagcag-3'	Sequenzierung
R279KEpac FOR	5'-ggtgaatgatgcacccaaggcagccac catcatcc-3'	Mutagenese
R279KEpac REV	5'-ggatgatggtggctgccttgggtgcatc attcacc-3'	Mutagenese
Oligo-dT <sub>15</sub>	5'-aaaaaaaaaaaaaaaaa-3'	RT-PCR
$\Delta$ CDC25PLC- $\varepsilon$ FOR	5'-taatacgactcactataggg-3' (T7- Primer)	PCR
$\Delta$ CDC25PLC- $\varepsilon$ REV	5'-ttctcgaggccttctgtgagtcctctgaag gctgcagatcgatcagctccttg-3'	PCR

### 3.1.4.3 Plasmide

#### a) eukaryotische Expressionsvektoren

<u>Name</u>	<u>Expressionsprodukt</u>	<u>Herkunft</u>
pcDNA3 [ <i>flag</i> - $\beta_2$ -AR]	<i>flag-getaggte</i> $\beta_2$ -AR	Dr. R. Jockers
pcDNA3 [ <i>myc</i> -PLC- $\epsilon$ ]	<i>myc-getaggte</i> PLC- $\epsilon$	Dr. J.W. Lomasney
pcDNA3 [ <i>myc</i> - H1144L PLC- $\epsilon$ ]	<i>myc-getaggte</i> H1144L PLC- $\epsilon$	Dr. J.W. Lomasney
pcDNA3 [ <i>myc</i> - $\Delta$ CDC25 PLC- $\epsilon$ ]	<i>myc-getaggte</i> $\Delta$ CDC25 PLC- $\epsilon$	diese Arbeit
pcDNA3 [PLC- $\delta$ 1]	PLC- $\delta$ 1	Dr. J.W. Lomasney
pcDNA3 [H-Ras]	H-Ras	Dr. J.L. Bos
pcDNA3 [B-Raf]	B-Raf	Dr. P.J.S. Stork
pcDNA3 [ <i>myc</i> -Raf-1]	<i>myc-getaggtes</i> Raf-1	Dr. P.J.S. Stork
pRK5 [K298M c-Src]	K298M c-Src	Dr. J.T. Parsons
pRK5 [PLC- $\beta$ 1]	PLC- $\beta$ 1	Dr. D. Illenberger
pRK5 [Rap2B]	Wildtyp-Rap2B	Dr. J. de Gunzburg
pRK5 [S17N Rap1A]	S17N Rap1A	Dr. J. de Gunzburg
pRK5 [S17N Rap2B]	S17N Rap2B	Dr. J. de Gunzburg
pRK5 [G12V Rap2B]	G12V Rap2B	Dr. H. Rehmann
pMT2 [ <i>HA</i> -Epac1]	<i>HA-getaggtes</i> Wildtyp-Epac1	Dr. J. de Rooij
pMT2 [ <i>HA</i> -R279K Epac1]	<i>HA-getaggtes</i> R279K Epac1	diese Arbeit
pMT2 [ <i>HA</i> -GRP1]	<i>HA-getaggtes</i> GRP1	Dr. J. de Rooij
pMT2 [ <i>HA</i> -GRP2]	<i>HA-getaggtes</i> GRP2	Dr. J. de Rooij
pMT2 [ <i>HA</i> -GRP3]	<i>HA-getaggtes</i> GRP3	Dr. J. de Rooij
pMT2 [ <i>HA</i> -RapGAPII]	<i>HA-getaggtes</i> RapGAPII	Dr. H. Rehmann
pMT3 [GRF1]	GRF1	Dr. L. A. Feig
pMT3 [GRF2]	GRF2	Dr. L. A. Feig
pMT25M [S17N H-Ras]	S17N H-Ras	Dr. J. L. Bos

#### b) prokaryotische Expressionsvektoren

<u>Name</u>	<u>Expressionsprodukt</u>	<u>Herkunft</u>
pGEX [ <i>GST</i> -Raf1-Kinase]	<i>GST-getaggte</i> Raf-1-Kinase	Dr. R. Wolthuis

pGEX [GST-RalGDS-RBD]	<i>GST-getaggtes</i> RalGDS-RBD	Dr. J. de Rooij
pGEX [GST-Rap2B]	<i>GST-getaggtes</i> Rap2B	Dr. H. Rehmann

pET23A	-	Invitrogen
--------	---	------------

c) Klonierungsvektoren

pGEM Teasy	Promega
------------	---------

### 3.1.5 Antikörper, Toxine

#### 3.1.5.1 Antikörper

<u>Name</u>	<u>Spezies</u>	<u>Hersteller/Lieferfirma</u>
<i>myc</i> -spezifischer Antikörper	Maus	Calbiochem
B-Raf-spezifischer Antikörper	Kaninchen	Santa Cruz
Epac1-spezifischer Antikörper	Kaninchen	Santa Cruz
Epac2-spezifischer Antikörper	Kaninchen	Santa Cruz
ERK1/ERK2-spezifischer Antikörper	Ziege	Santa Cruz
c-Src-spezifischer Antikörper	Kaninchen	Santa Cruz
Peroxidase-gekoppelter kaninchen-spezifischer Antikörper	Ziege	Sigma
Peroxidase-gekoppelter maus-spezifischer Antikörper	Ziege	Dianova
Phospho-ERK1/ERK2-spezifischer Antikörper	Kaninchen	New England Biolabs
PLC- $\epsilon$ -spezifischer Antikörper	Kaninchen	Dr. J.W. Lomasney
Raf-1-spezifischer Antikörper	Kaninchen	Santa Cruz
Rap2-spezifischer Antikörper	Kaninchen	Santa Cruz
H-Ras-spezifischer Antikörper	Kaninchen	Santa Cruz
<i>HA</i> -spezifischer Antikörper	Maus	Roche Molecular Biochemicals

#### 3.1.5.2 Toxine

<u>Name</u>	<u>Hersteller/Lieferfirma</u>
Pertussistoxin	List Biological Laboratories

### 3.1.6 Sonstige Verbrauchsmaterialien

<u>Name</u>	<u>Hersteller/Lieferfirma</u>
Anionenaustauscher AG 1-X8	Bio-Rad
Anionenaustauscher AG 50-X8	Bio-Rad
BCA Protein Assay Reagent	Pierce
Chromatographie-Blotpapier	Whatman
Emulsifier Szintillator Plus/299	Canberra Packard
Filmentwickler Lösung Neutol Liquid NE	Agfa Gevaert
Filmfixierer Lösung Agefix	Agfa Gevaert
GF/C-Filter	Whatman
Kodak X-OMAT AR-Filme	Kodak
Nitrocellulosemembranen	Advanced Microdevices
Oligotex mRNA Kit	Qiagen
Plasmid Mini, Midi & Mega Kit	Qiagen
Plastik-Einmalküvetten	Sarstedt
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Eppendorf
RNeasy Mini Kit	Qiagen
Röhrchen ( 3,5; 6,5 ml)	Sarstedt
Snap Caps	Sarstedt
Sterilfilter (0,20 µm)	Sartorius
Szintillationsgefäße	Packard
Zellkulturflaschen (125; 250; 500 ml)	Falcon
Zentrifugenröhrchen (15; 50 ml)	Falcon

## 3.2 Geräte

### Sicherheitswerkbänke

LaminarAir HA 2472 GS	Heraeus
Microflow Klasse 2 Sicherheitswerkbank	Heraeus

### Zentrifugen

Megafuge 1.0 R (Rotor 1379)	Heraeus
Sorvall RC-5B (Rotoren SS-34; GSA)	DuPont
Biofuge 13	Heraeus

### Brutschränke

B5060EK/CO <sub>2</sub>	Heraeus (HEK-293, N1E-115)
GTR 0241	Memmert (Bakterien)

### Sonstiges

Axiovert 25 (Mikroskop)	Zeiss
Cell Porator	Biometra
GelDryer Model 543	Bio-Rad
Hitachi F-2000 (für Calciummessung)	Hitachi
Labsonic U (Sonifizierung)	Braun
Mini Sub <sup>TM</sup> DNA Cell (Agarosegele)	Bio-Rad
Protean II xi Cell (Gele)	Bio-Rad
REAX2 (Überkopfschüttler)	Heidolph
Spektrophotometer LKB Biochrom Ultrospec II	Pharmacia
Szintillationszähler Beckmann LS 6000 SC	Beckmann
Thermoblock	Eppendorf
T Personal (PCR)	Biometra
Ultra-Turrax	Jahnke & Kunkel
Warmluftschüttler Certomat	Braun

### 3.3 Methoden

#### 3.3.1 Zellkultivierung (Schmidt *et al.*, 1994; Schmidt *et al.*, 2001)

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Zelllinien eingesetzt: HEK-293-Zellen, die den muskarinischen Acetylcholin-Rezeptor (mAChR) des Subtyps M<sub>3</sub> mit einer Dichte von ungefähr 200.000 Rezeptoren pro Zelle exprimieren (Peralta *et al.*, 1988), und N1E-15-Neuroblastomzellen, die von den sympathischen Ganglien der Maus abstammen (Amano *et al.*, 1972). Die Zellkulturarbeiten fanden an einer sterilen Werkbank mit laminarer Verdrängungsströmung statt. Die dazu erforderlichen Arbeitsgeräte und Lösungen bzw. Medien wurden bei 121°C für 20 min autoklaviert oder steril filtriert. Für die Zellkultur benötigte Pipetten, Zellkulturschalen und andere Verbrauchsmaterialien bestanden aus sterilem Einwegmaterial aus Kunststoff. Als Nährmedium diente DMEM/F12-Medium (pH 7,2) mit 10 % FKS (v/v), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin. Zur Selektion der M<sub>3</sub> mAChR-Expression wurde dem Nährmedium für HEK-293-Zellen Geneticin (G418, 0,5 mg/ml) zugegeben. Die Zellen wurden auf 145-mm-Zellkulturschalen mit 20 ml Wachstumsmedium im Brutschrank bei 37°C in einer feuchten Atmosphäre aus 95 % Luft und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Vor Versuchsbeginn säte man die Zellen auf 35-mm- bzw. 60-mm-Zellschalen oder 24-Loch-Zellkulturplatten aus. Diese Zellschalen wurden teilweise mit Poly-L-Lysin (MM >300 kDa; Konzentration: 0,1 mg/ml) vorbehandelt, um ein besseres Anhaften der HEK-293-Zellen zu erreichen. Neuroblastomzellen wurden durch eine Vorbehandlung mit Ca<sup>2+</sup>-freiem Versene abgelöst.

Für die Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff wurden die Zellen geerntet und in 1 ml Einfriermedium (45 % (v/v) DMEM/F-12, 45 % (v/v) FKS und 10 % (v/v) DMSO) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde dann in Kryoröhrchen aliquotiert und für 24 h bei -70°C zwischengelagert, bevor sie schließlich in flüssigen Stickstoff überführt wurde. Für den Wiedergebrauch wurden die Zellen zügig aufgetaut und das DMSO durch Zentrifugation (1.700 U/min; 5 min; RT) und Resuspension des Zellsediments in DMSO-freiem Medium entfernt. Die Zellen wurden in insgesamt 20 ml DMEM/F12-Medium in einer 145-mm-Zellkulturschale kultiviert.



Versene, pH 7,2:

NaCl	137 mM
KCl	2,6 mM
EDTA	0,54 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8,4 mM

**3.3.2 Transfizierung von Zellen** (Schmidt *et al.*, 2001)

Mit Hilfe von Transfizierungen wurde die cDNA entsprechender Zielproteine in Zellen eingebracht. Zellen (etwa 70 - 80 % konfluent) wurden einen Tag vor der Transfizierung mit frischem Nährmedium versorgt. Die entsprechenden Mengen an rekombinanter Plasmid-cDNA wurden durch eine Ethanolfällung sterilisiert. Dazu wurde das DNA-Gemisch in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit sterilem dH<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 80 µl aufgefüllt. Nach Ansäuern der Lösung mit 20 µl Natriumacetat (3 M; pH 5,2) fällte man die cDNA durch Zugabe von 250 µl Ethanol 96% (4°C) aus. Die gefällte cDNA wurde abzentrifugiert (10 min; 13.000 U/min) und an der Luft getrocknet. Nach Resuspension in 700 µl sterilem dH<sub>2</sub>O wurde die cDNA zusammen mit 300 µl einer 2 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung in ein 15-ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Man fügte dem cDNA/CaCl<sub>2</sub>-Gemisch 1 ml HeBS 2x zu, mischte die Lösung sofort gründlich und ließ die Mischung für ~10 min bei RT stehen, um die DNA zu präzipitieren. Um den DNA-Abbau in den Lysosomen zu verhindern, wurden auf die Zellkulturschalen 200 µl einer 10 mM Chloroquinlösung gegeben. Nach der Inkubationszeit verteilte man das cDNA/Calciumphosphat-Präzipitat vorsichtig auf den Zellkulturschalen und inkubierte die Zellen je nach Dichte 3 bis 5 h lang im Brutschrank. Anschließend wurden die Zellen zunächst mit FKS-freiem DMEM/F12-Medium gewaschen und dann mit 20 ml DMEM/F12-Nährmedium versorgt. Die Zellen wurden nach 24 h für die jeweiligen Experimente kultiviert. Die jeweiligen Versuche wurden 48 h nach Transfizierung in serum-depletierten Zellen durchgeführt.

HeBS 2x, pH 7,05

NaCl	280 mM
HEPES	50 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,48 mM

### 3.3.3 Zellzählung

Zur Ermittlung der Zellzahl wurden transfizierte oder untransfizierte Zellen in der Neubauerkammer gezählt. Auf diesem speziellen Objektträger befinden sich 2 Netzquadrate, welche in 9 Großquadrate mit der Seitenlänge von 0,0025 mm unterteilt sind. Diese wiederum sind in 16 Kleinquadrate untergliedert. Wenn ein zugehöriges, spezielles Deckglas auf die Kammer gelegt wird, entsteht zwischen den Netzquadraten und dem Deckglas ein Abstand von 0,1 mm, so dass über jedem Großquadrat ein Volumen von  $0,0025 \times 0,0025 \times 0,1 = 6 \times 10^{-7} \text{ mm}^3$  entsteht. Zunächst wurden Zellen in 10 ml Nährmedium abgelöst und sedimentiert (1.700 U/min; 5 min). Nach Resuspension der Zellen in 20 ml Nährmedium wurden 50 µl der Zellsuspension mit 450 µl Trypan-Blau (0,18 %) gemischt und in der Neubauerkammer gezählt. Das Trypan-Blau wird nur von toten Zellen aufgenommen, da ihre Zellmembran nicht mehr funktionstüchtig ist und deshalb der Farbstoff in die Zellen eindringen kann. Diese Zellen erscheinen im Gegensatz zu den vitalen Zellen mit intakter Zellmembran unter dem Mikroskop blaugefärbt, wohingegen die vitalen Zellen weiß erscheinen. Für die Ermittlung der Zellzahlen wurden nur die vitalen Zellen verwandt. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen auf die gewünschte Zelldichte eingestellt.

### 3.3.4 Radioaktive Markierung der Zellen (Schmidt *et al.*, 1994)

Die radioaktive Markierung der zellulären Phosphoinositide erfolgte vor Versuchsbeginn durch Zugabe von myo-[ $^3\text{H}$ ]Inositol (0,5 µCi/ml; spezifische Aktivität: 18 Ci/mMol) in FKS/Inositolfreiem DMEM-Medium, welches mit 1,575 mg/ml D(+)-Glukose, 52,5 mg/ml L-Leucin, 15,0 mg/ml L-Methionin, 292,0 mg/ml L-Glutamin, 42,0 mg/ml L-Arginin, 28,16 mg/ml L-Cystein, 100 u/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin komplementiert wurde.

### 3.3.5 Bestimmung der PLC-Aktivität (Schmidt *et al.*, 2001)

Zur Bestimmung der [ $^3\text{H}$ ]Inositolphosphat ([ $^3\text{H}$ ]IP<sub>x</sub>)-Bildung wurden konfluente Zellen auf 35-mm-Zellkulturschalen mit myo-[ $^3\text{H}$ ]Inositol markiert. Nach Entfernung des radioaktiven Mediums und 10 minütiger Äquilibration mit HBSS bei 37°C inkubierte man die Zellen für 30 min bei 37°C mit den entsprechenden Agonisten, der

in HBSS/LiCl gelöst war. LiCl verhindert die Dephosphorylierung von Inositolphosphaten (IP) zu Inositol und ermöglicht so die Messung der durch die PLC gebildeten  $[^3\text{H}]\text{IP}_x = [^3\text{H}]\text{IP} + [^3\text{H}]\text{IP}_2 + [^3\text{H}]\text{IP}_3$  (Berridge *et al.*, 1982). Die Stimulation wurde mit der Entfernung des Mediums und der Zugabe von 0,5 ml eiskaltem Methanol abgestoppt. Die Weiterverarbeitung der Proben verlief dann auf Eis. Die Zellen wurden in insgesamt 1 ml Methanol geerntet und in 3,5-ml-Reaktionsgefäße überführt. Nach Zugabe von 1 ml Chloroform und 0,5 ml dH<sub>2</sub>O wurden die Proben gut gemischt und für 10 min bei 4°C und 3.400 U/min zentrifugiert, um die lipophile und hydrophile Phase, welche die  $[^3\text{H}]\text{IP}_x$  enthält, zu trennen. Anschließend gab man jeweils 1 ml der oberen hydrophilen Phase auf äquilibrierte Anionenaustauscher-Säulen (Bio-Rad AG 1-X8 200-400 mesh, Chloridform), an welche  $[^3\text{H}]\text{IP}_x$  binden. Zur Entfernung von freiem *myo*- $[^3\text{H}]\text{Inositol}$  und von  $[^3\text{H}]\text{Glycerophosphoinositiden}$  wurden die Säulen zuerst mit 6 ml dH<sub>2</sub>O und 5 ml 50 mM Ammoniumformiat gewaschen. Zur Elution der  $[^3\text{H}]\text{IP}_x$ -Fraktion wurden die Säulen mit 6 ml 1 M Ammoniumformiat plus 0,1 M Ameisensäure gewaschen. Zu jeweils 1 ml des Eluates gab man 3 ml Szintillationsflüssigkeit und konnte dadurch die Radioaktivität im Szintillationszähler messen. Die benutzten Säulen wurden mit 6 ml 2 M Ammoniumformiat plus 0,1 M Ameisensäure und 2 x 7 ml dH<sub>2</sub>O regeneriert. Die Ansätze wurden jeweils in Triplikaten durchgeführt. Die  $[^3\text{H}]\text{IP}_x$ -Bildung wurde in  $\text{cpm} \times 10^{-3} \times \text{mg}^{-1}$  Protein angegeben.

<u>HBSS, pH 7,4</u>	<u>HBSS/LiCl</u>
NaCl	118 mM plus 10 mM LiCl
KCl	5 mM
CaCl <sub>2</sub>	1 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
D(+)-Glukose	5 mM
HEPES	15 mM

### 3.3.6 Massenbestimmung von IP<sub>3</sub> (Schmidt *et al.*, 2000)

Für die Messung der Masse von IP<sub>3</sub> wurden unmarkierte Zellen auf 35-mm-Zellkulturschalen bis zur Konfluenz kultiviert. Nach 10 min Äquilibrierung in HBSS wurden die Zellen für die in den Abbildungslegenden angegebenen Zeiten mit den

entsprechenden Agonisten behandelt. Durch Zugabe von 0,5 ml eiskalter Trichloressigsäure (TCA; 0,5 M) stoppte man die Reaktion ab, um dann die Zellschalen für 30 min auf Eis zu lagern. Zur Bestimmung der Bildung von  $\text{IP}_3$  wurde zunächst die flüssige Phase in 6,5-ml-Reaktionsgefäße überführt. Zur TCA-Entfernung wurde zu den Ansätzen 3x 1,5 ml  $\text{dH}_2\text{O}$ -gesättigten Diethylether ( $\text{H}_2\text{O}$ :Diethylether 1:2 (v:v)) addiert. Nach Durchmischung wurde die obere Phase abgesaugt. Anschließend wurden 200  $\mu\text{l}$  der wässrigen Phase mit 50  $\mu\text{l}$  EDTA (30 mM) und 50  $\mu\text{l}$   $\text{NaHCO}_3$  (60 mM) vermischt, um die Proben zu stabilisieren. Diese Ansätze konnten bis zu 14 Tage bei 4°C aufbewahrt werden. Anschließend wurde der spezifische  $\text{IP}_3$ -Rezeptorbindungs-Assay durchgeführt.

Das  $\text{IP}_3$ -Bindungsprotein reinigte man aus Nebennieren von Rindern. Nach Entfernung der inneren Medulla wurde der äußere Cortex gesammelt und auf Eis gelagert. Pro g Cortex gab man 2 ml Homogenisierungspuffer (20 mM  $\text{NaHCO}_3$ ; 1 mM Dithiothreitol; pH 8.0) zu. Die Mischung wurde dann  $5 \times 20$  s auf Eis zerkleinert (Ultra-Turrax; Stufe 5-6). Nach Zentrifugation bei 5.000 U/min (10 min; 4°C) wurde der Überstand weiterverarbeitet. Um die Effizienz der Reinigung zu erhöhen, resuspendierte man das Sediment nochmals in derselben Menge Homogenisierungspuffer, zerkleinerte und zentrifugierte es. Anschließend wurden die beiden Überstände vereinigt und bei 15.000 U/min (20 min; 4°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in Homogenisierungspuffer resuspendiert. Diesen Waschvorgang wiederholte man insgesamt viermal. Nach dem letztem Waschschrift wurde jedes Pellet in 8 ml Homogenisierungspuffer resuspendiert und zusammengeführt. Dann führte man eine Proteinbestimmung durch. Der Proteingehalt wurde auf ~15 mg/ml eingestellt und Aliquots wurden bei -80°C für bis zu 3 Monate gelagert.

Für den Bindungsversuch wurden 30  $\mu\text{l}$  des isolierten  $\text{IP}_3$ -Bindungsproteins zusammen mit 30  $\mu\text{l}$  [ $^3\text{H}$ ] $\text{IP}_3$  (0,036 bis 36 pmol; 5.000 cpm/Ansatz), 30  $\mu\text{l}$  Probe und 30  $\mu\text{l}$  Assaypuffer (100 mM Tris/HCl; 4 mM EDTA; pH 8,0) für 30 min bei 4°C in 3,5-ml-Röhrchen inkubiert. Die Reaktion stoppte man durch Zugabe von 3 ml eiskaltem Waschpuffer (25 mM Tris/HCl; 1 mM EDTA; 5 mM  $\text{NaHCO}_3$ ; pH 8,0) ab. Zur Trennung von freiem und gebundenem  $\text{IP}_3$  wurden die Proben über GF/C-Filter gegeben. Die Filter wurden noch zweimal mit je 3 ml Waschpuffer gewaschen, mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und die Radioaktivität mittels Szintillationszählung bestimmt. Der zelluläre Gehalt an  $\text{IP}_3$  wurde in pmol/mg Protein angegeben.

**3.3.7 B-Raf / Raf-1-Kinase-Aktivität** (Schmitt & Stork, 2002b)

Zur Bestimmung der *in vitro* Aktivität der Kinasen B-Raf und Raf-1 wurden transfizierte Zellen bis zur Konfluenz auf 100-mm-Zellschalen kultiviert. Nach einer 10-minütigen Äquilibration mit HBSS wurden die Zellen mit dem entsprechenden Agonisten stimuliert und die Reaktion nach festgelegter Zeit mit dem Lysierungspuffer abgestoppt. Das Lysat wurde auf Eis in Reaktionsgefäße überführt, zentrifugiert (5 min; 1.700 U/min; 4°C), und anschließend wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt. B-Raf- bzw. Raf-1-Antikörper wurden an Agarose-Beads gekoppelt, um „aktivierte“ B-Raf bzw. Raf-1 aus den Lysaten zu extrahieren. Dazu wurden die Agarose-Beads einmal in PBS gewaschen. Pro Ansatz wurde 1 µg Antikörper (anti-B-Raf oder anti-Raf-1) zu 40 µl Agarose-Beads gegeben, mit Lysierungspuffer auf 500 µl aufgefüllt und eine Stunde im Überkopfschüttler bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Beads dreimal mit Lysierungspuffer gewaschen. Anschließend gab man je 1 mg Zelllysat zu den Agarose-Beads und inkubierte erneut für vier Stunden im Überkopfschüttler bei 4°C. Danach wurden die Ansätze 3 x mit Lysierungspuffer gewaschen und nach dem dritten Waschschrift in 20 µl Assay *dilution buffer* (ADB) aufgenommen.

Zu den in ADB resuspendierten Beads gab man je Ansatz 10 µl  $\text{Mg}^{2+}$ /[ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP-Mix (75 mM  $\text{Mg}^{2+}$ ; 0,75 MBq [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP) und 0,4 µg nicht phosphorylierte MAP-Kinase-Kinase (MEK-1). Die so präparierten Ansätze wurden bei 30°C für 30 min inkubiert, die Reaktion mit 25 µl 2x Laemmli-Puffer abgestoppt und die Proben auf einer 10%igem SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Die anschließende Detektion der phosphorylierten Proteine erfolgte durch Autoradiographie mit Kodak X-Omat AR-Filmen, die bei –80°C exponiert und danach entwickelt wurden.

<u>Lysierungspuffer</u>	<u>ADB (Assay Dilution Buffer)</u>	
Glycerin	10% MOPS (pH 7,2)	20 mM
Nonidet-P40	1% $\beta$ -Glycerinphosphat	25 mM
Tris-HCl (pH 7,4)	50 mM EGTA	5 mM
NaCl	200 mM Orthovanadat	1 mM
MgCl <sub>2</sub>	2 mM DTT	1 mM
$\beta$ -Glycerinphosphat	0,2 mM	

PMSF	1 mM
Aprotinin	2 µg/ml
Leupeptin	1 µg/ml
Sojabohnen-Trypsininhibitor	10 µg/ml
Orthovanadat	2 µg/ml

### 3.3.8 Bestimmung von $[Ca^{2+}]_i$ (Schmidt *et al.*, 2001)

Zur Messung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) wurden die Zellen von 145-mm-Zellschalen abgelöst und 5 min bei 1.700 U/min bei RT zentrifugiert. Das Zellsediment resuspendierte man in 20 ml HBSS plus 10 mg/ml D-Glukose und 10 mg/ml BSA (ca.  $5 \times 10^5$  Zellen/ml), um es dann für 1 h im Dunkeln bei RT mit dem fluoreszierenden  $Ca^{2+}$ -Indikator Fura-2/AM (0,5 µM) zu beladen. Die beladenen Zellen wurden bei 1.700 U/min für 5 min erneut pelletiert, in HBSS/Glukose/BSA resuspendiert und nochmals zentrifugiert. Anschliessend wurden die Zellen in 20 ml HBSS/Glukose/BSA aufgenommen und je 2 ml davon in Messküvetten überführt. In Ab- und Anwesenheit der angegebenen Agonisten wurde dann die  $[Ca^{2+}]_i$  innerhalb der nächsten Stunde in einem Spektrophotometer bestimmt. Dazu wurde alle 500 ms mit wechselnden Anregungswellenlängen (340 nm und 380 nm) gemessen, da der Farbstoff Fura-2 ( $\lambda = 510$  nm) in der  $Ca^{2+}$ -gebundenen Form die maximale Anregung bei  $\lambda = 340$  nm und in der  $Ca^{2+}$ -freien Form bei  $\lambda = 380$  nm erreicht. Die maximale Emission von Fura-2 in der  $Ca^{2+}$ -gebundenen Form wurde nach Permeabilisierung der Zellen mit Digitonin (0,03 %) bestimmt. Durch anschließende Zugabe von EGTA (15 mM), welches mit  $Ca^{2+}$  einen Komplex bildet, wurde das Emissionsmaximum von Fura-2 in der  $Ca^{2+}$ -freien Form ermittelt.  $[Ca^{2+}]_i$  wurde anschließend mit der vom Hersteller zur Verfügung gestellten Software errechnet (Hitachi F-2000).

### 3.3.9 Bestimmung der Aktivierung von Rap und Ras

**Herstellung von GST-RalGDS-RBD und GST-Raf-1-RBD aus *E. coli***  
(Franke *et al.*, 1997)

Um die GTP-Beladung, d.h. Aktivierung von Ras- und Rap-Proteinen zu bestimmen, wurden die unterschiedlichen Affinitäten der GTP- bzw. GDP-beladenen GTPasen zu ihren Effektoren genutzt. Nur GTP-beladene Ras/Rap-Proteine

interagieren mit den Ras/Rap-Bindungsdomänen (RBD) der Effektoren RalGDS für Rap bzw. Raf-1 für Ras. In *E. coli*-Stämmen wurden die RBD von RalGDS (97 Aminosäuren) bzw. Raf-1 (80 Aminosäuren) als GST-getaggte Proteine exprimiert. GST-RalGDS-RBD- bzw. GST-Raf-1-RBD-exprimierende *E. coli*-Stämme kultivierte man zuerst auf LB-Agar-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin. Eine Einzelkolonie wurde dann in 100 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin angeimpft und über Nacht bei 37°C im Warmluftinkubator bei 180 U/min inkubiert. Am nächsten Tag überführte man diese Vorkultur in 900 ml LB-Medium mit 900 µl Ampicillin und kultivierte diese bis zu einer bei 600 nm gemessenen OD zwischen 0,3 und 0,4. Dann wurde für 3 h bei 37°C die Proteinsynthese durch Zugabe von 0,1 mM IPTG induziert, bis die OD 0,9 bis 1,0 betrug. Anschließend sedimentierte man die Bakterien 15 min bei 6.000 U/min. Die Pellets wurden in 40 ml PBS (pH 7,2) mit 0,5 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 µg/ml Leupeptin, 10 µg/ml Sojabohnen-Trypsininhibitor, 100 nM Aprotinin, 10 µg/ml Benzamidin und 1 mM Orthovanadat resuspendiert. Der Aufschluss der Bakterien erfolgte auf Eis durch Ultraschall (Ultra-Turrax; Stufe 5-6; 10 x 30 s) und anschließende Zugabe von 1 % Triton X-100 (4°C; Überkopfschüttler; 30 min). Die zytosolische Fraktion (~40 ml) wurde dann durch eine 10-minütige Zentrifugation (18.000 U/min; 4°C) von der Membranfraktion abgetrennt, in 15 ml Falcon-Röhrchen aliquotiert und bei -20°C gelagert.

GST-RalGDS-RBD und GST-Raf-1-RBD wurden an Glutathion-Sepharose-Beads gekoppelt. Hierfür wurden 1,5 ml Bead-Material 3 x mit je 10 ml PBS gewaschen. Ein Aliquot des Bakterien-Überstands wurde zu den Beads gegeben, und dieser Ansatz wurde bei 4°C für mindestens 1 h im Überkopfschüttler inkubiert. Nach Bindung von GST-RalGDS-RBD bzw. GST-Raf-1-RBD an die Glutathion-Sepharose-Beads wurden die Beads 3 x mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Beads in 0,7 ml Tris/HCl (50 mM; pH 8,0) mit 1 mM PMSF, 1 µg/ml Leupeptin, 10 µg/ml Sojabohnen-Trypsininhibitor und 100 nM Aprotinin aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert. Die Proteinkonzentration wurde photometrisch bestimmt und die Reinheit der Proteine durch ein SDS-PAGE (12,5 % (m/v)) und anschließende Coomassie-Färbung überprüft.

**Pull-down Assay** (Franke et al, 1997)

Hierfür wurden die Zellen bis zur Konfluenz auf 60-mm-Kulturschalen kultiviert und über Nacht in serumfreien Medium gehalten. Nach Entfernen des Mediums wurden die Zellen für 10 min in HBSS äquilibriert und für die in den Abbildungslegenden angegebenen Zeiten mit den entsprechenden Agonisten bei 37°C inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 1 ml eiskaltem Fisch-Puffer. Die Zellen wurden sofort auf Eis abgelöst, und anschliessend wurde das Zelllysate bei 10.000 U/min und 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit 15 µg GST-RaIGDS-RBD bzw GST-Raf-1-RBD bei 4°C für 1 h im Überkopfschüttler inkubiert. Dann wurden die GST-RaIGDS-RBD/Rap-GTP-Komplexe bzw die GST-Raf-1-RBD/Ras-GTP-Komplexe dreimal mit Fisch-Puffer gewaschen und bei 3.000 U/min für 2 min zentrifugiert. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt versetzte man die Ansätze mit 100 µl 3,3 x Laemmli-Puffer und erhitzte für 10 min bei 95°C. Die Proben wurden auf ein 12,5 %-iges (m/v) SDS-PAGE geladen, elektrophoretisch getrennt und auf Nitrocellulosemembranen geblottet. Die anschließende Immunoblot-Detektion erfolgte mit Rap-spezifischen bzw. H-Ras-spezifischen Antikörpern (1 h; Verdünnung 1:500). Die Ansätze wurden jeweils in Duplikaten durchgeführt.

Fisch-Puffer, pH 7,5

Glycerol	10 % (v/v)
Nonidet P 40	1 % (v/v)
Tris-HCl	50 mM
NaCl	200 mM
MgCl <sub>2</sub>	2 mM
PMSF	1 mM
Aprotinin	100 nM
Leupeptin	1 µg/ml
Sojabohnen-Trypsininhibitor	10 µg/ml

3,3x Laemmli-Puffer, pH 7,5

Glycerol	33 % (v/v)
SDS	6,6 % (m/v)
2-Mercaptoethanol	20 % (v/v)
Bromphenolblau	0,1 % (m/v)
Tris-HCl	20 mM

**3.3.10 Bestimmung der Aktivierung von ERK1/ERK2** (Voß et al., 1999)

Als Maß für den Aktivitätszustand der MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 wurden deren Phosphorylierung mittels Phospho-spezifischer ERK-Antikörper bestimmt. Für



die Versuche wurden Zellen auf 35-mm-Zellschalen kultiviert und für 24 bzw. 48 h in serumfreien Medium gehalten. Nach Äquilibration der Zellen für 10 min bei 37°C in HBSS erfolgte die Stimulation mit den entsprechenden Agonisten für die in den Abbildungslegenden angegebenen Zeiten. Die Reaktion wurde mit 0,2 ml heißem SDS-Puffer (10 mM Tris, 1 % SDS) abgestoppt. Das Lysat wurde in 1,5-ml-Reaktionsgefäße überführt und für 10 min bei 95°C erhitzt. Mittels einer 25-G-Kanüle wurden die Proben homogenisiert. Nach der Proteinbestimmung mittels der BCA-Methode wurden jeweils 50-100 µg Protein mit Laemmli-Puffer versetzt und erneut erhitzt. Die Proben wurden auf einem 12,5 %-igem (m/v) SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulosemembranen geblottet. Die anschließende Immunoblot-Detektion von Phospho-ERK1/ERK2 erfolgte mit einem Phospho-spezifischen ERK-Antikörper (1 h; Verdünnung 1: 500). Der Gesamtgehalt an ERK1/ERK2 wurde durch einen ERK-spezifischen Antikörper (1 h; Verdünnung 1: 1000) ermittelt. Die Versuche wurden in Doppelbestimmungen durchgeführt.

#### **3.3.11 Immunfällungen** (Stope *et al.*, 2004)

Durch diese Versuche wurde die transiente Expression von *c-myc*- bzw. *HA*-getaggten Proteinen ermittelt. Bei nahezu konfluenten, transfizierten Zellen wurde das Nährmedium entfernt und die Zellen für 10 min in HBSS äquilibriert. Anschliessend wurden die Zellen 2 x mit 10 ml eiskaltem PBS gewaschen und durch Zugabe von 1 ml RIPA-Puffer-Komplett lysiert. Das Lysat wurde in 1,5-ml-Reaktionsgefäße überführt und 10 min auf Eis inkubiert. Anschliessend zentrifugierte man das Zelllysate für 10 min bei 10.000 U/min (4°C). Im Überstand wurde der Proteingehalt bestimmt.

Zur Vorbereitung der Agarosebeads wurden diese mit RIPA-Puffer gewaschen und dann mit dem jeweiligen Antikörper in einer Konzentration von 4 µg/Ansatz 2 h bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Beads 3 x mit RIPA-Puffer-Komplett gewaschen und dann in 20 µl RIPA-Puffer-Komplett pro Probe aufgenommen.

Nach Bestimmung des Proteingehaltes wurde jeder Ansatz auf eine Konzentration von 4 mg/ml eingestellt, je 20 µl gekoppelte Agarosebeads hinzugefügt und anschließend mit RIPA-Puffer-Komplett auf ein identisches Volumen aufgefüllt. Diese Proben wurden über Nacht im Überkopfschüttler (4°C) inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Ansätze 3 x mit RIPA-Puffer-Komplett gewaschen und mit 50 µl 2 x Laemmli bei 95°C denaturiert. Nachfolgend wurden die Proben auf 8-10%-ige (m/v) SDS-PAGE geladen, elektrophoretisch getrennt und auf Nitrocellulosemembranen geblottet. Die anschliessende Immunoblotdetektion erfolgte mit *c-myc*-spezifischen (2 h; Verdünnung 1:500) bzw. *HA*-spezifischen Antikörpern (2 h; Verdünnung 1:500). Die Ansätze wurden jeweils in Dreifachbestimmungen durchgeführt.

<u>PBS</u>		<u>RIPA-Puffer</u>	
NaCl	150 mM	Tris-HCl	0,05 M
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x2H <sub>2</sub> O	5,5 mM	NaCl	0,15 M
KCl	2,7 mM	Na-pyrophosphat	0,01 M
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	84,5 mM	NaF	0,05 M
Orthovanadat	0,1 mM	EGTA	0,01 M
		Nonidet P40	1 %
		Na-desoxycholat	0,5 %
		SDS	0,1 %

#### RIPA-Puffer-Komplett

Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> pH 10	0,1 mM
PMSF	1 mM
Leupeptin	10 µg/ml
Aprotinin	25 µg/ml

### **3.3.12 Kristallviolett-Färbung** (Meyer zu Heringdorf *et al.*, 2003)

Zur Ermittlung der Zellproliferation wurden Zellen nach Zellzählung auf 10<sup>6</sup> Zellen/50 ml eingestellt und auf 24-well Platten (4 x 10<sup>4</sup> Zellen/Loch) kultiviert. Nach 12 h wurden die Zellen in serumfreien Medium mit den entsprechenden Agonisten behandelt und nach jeweils 24, 48, 72 und 96 h zunächst in 1 ml HBSS äquilibriert. Danach gab man auf die Zellen 250 µl Kristallviolettlösung und inkubierte 15 min bei Raumtemperatur. Anschliessend wurde der überschüssige Farbstoff durch 5 x Waschen mit je 1 ml dH<sub>2</sub>O entfernt. Kristallviolett, das auch in der Gram-Färbung zur Unterscheidung von Bakterien eingesetzt wird, lagert sich irreversibel an die DNA einer Zelle. Indem man die Zellen mit 1 ml Essigsäure (33% (v/v)) lysiert, setzt man

den an die DNA-gebundenen Farbstoff wieder frei. Nach einer Inkubationszeit von 20 min konnte der Überstand abgenommen und der Gehalt an eingelagertem Kristallviolett photometrisch bei 595 nm bestimmt werden.

<u>Kristallviolettlösung</u>	Kristallviolett 0,5%
	Methanol/H <sub>2</sub> O 1:4

### 3.3.13 Membranpräparation

Membranpräparationen wurden durchgeführt, wenn das Zielprotein primär an Membranfraktionen lokalisiert war. Für diesen Versuch kultivierte man Zellen auf 145-mm-Schalen bis zur Konfluenz. Die Zellen wurden geerntet und sedimentiert (3.400 U/min; 10 min; 4°C). Anschließend resuspendierte man die Zellen in 15 ml HP-Puffer und zentrifugierte erneut. Zur Vorbereitung für die ‚Stickstoffbombe‘ wurden die Zellen in 20 ml Puffer B aufgenommen und für 30 min bei 25 bar Überdruck mit Stickstoff behandelt. Nach der Inkubationszeit entließ man schlagartig den Überdruck, um die Zellen mechanisch aufzuschließen. Das Homogenat wurde in EGTA aufgefangen (1,25 mM) und anschließend zentrifugiert (2.400 U/min; 10 min; 4°C). Der Überstand wurde über Kompressen (10 cm x 12,5 cm) filtriert, um Lipide aus der Lösung zu entfernen. Das Filtrat wurde erneut zentrifugiert (20.000 U/min; 15 min; 4°C) und in Puffer E aufgenommen. Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt. Anschliessend daran folgte eine Proteinbestimmung. Die Proben konnten nun sofort verwertet oder in flüssigem Stickstoff gelagert werden.

<u>HP-Puffer (pH 7,5)</u>		<u>Puffer A (pH 7,5)</u>	
NaCl	140 mM	Sucrose	8,56%
Triethanolamin	10 mM	Tris-HCl	20 mM
		MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
<u>Puffer B (Bombenpuffer)</u>		<u>Puffer E</u>	
Puffer A		Tris-HCl	20 mM
ATP	1 mM	EDTA	1 mM
Benzamidin	3 mM	DTT	0,5 mM
Leupeptin	1 µg/ml	Benzamidin	3 M
PMSF	1 mM	Leupeptin	1 µg/ml

Sojabohnen-Trypsininhibitor	10 µg/ml	PMSF	1 mM
		Sojabohnen-Trypsininhibitor	10 µg/ml

### 3.3.14 Proteinbestimmungen

Die zu bestimmenden Proteinproben wurden in Polystyrol-Einwegküvetten mit dH<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 800 µl aufgefüllt und mit 200 µl Bradford-Reagenz versetzt (Bradford, 1976). Parallel dazu wurde eine Eichreihe mit Proteinkonzentrationen von 0,4 bis 2,0 µg/ml mit Rinder-γ-Globulin als Standard angesetzt. Als Leerwert diente eine Lösung ohne Rinder-γ-Globulin. Die Proben wurden gründlich gemischt und nach 10 min bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Der Proteingehalt der Proben wurde über die ermittelte Eichkurve bestimmt.

<u>Bradford-Reagenz</u>	Serva-Blau G (Coomassie-Blau)	350 mg
	Ethanol	250 ml
	Phosphorsäure (85 %)	250 ml
		ad 1 l dH <sub>2</sub> O

Zur Proteinbestimmung für Proben, die in SDS-Puffer (10 mM Tris, 1 % SDS) verarbeitet wurden, wurde die BCA-Methode benutzt, da bei solchen Proben die Bradford-Methode nicht anwendbar ist (Smith *et al.*, 1985). Hierzu wurde das BCA Protein Assay Kit verwendet und das Standardprotokoll des Herstellers (Pierce) befolgt. Zur Proteinbestimmung wurde die Lichtabsorption bei 562 nm gemessen und die Protein-Konzentration über eine Standard-Eichreihe bestimmt.

### 3.3.15 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) (Laemmli, 1970)

Nach Bestimmung des Proteingehaltes wurden die entsprechenden Proteinmengen mit Laemmli-Puffer aufgefüllt und erhitzt (95°C). Für die Gele wurden Acrylamid und Bisacrylamid im Verhältnis 30:0,8 eingesetzt und mittels TEMED und Ammoniumperoxodisulfat polymerisiert. Der Acrylamidgehalt des Sammelgels betrug konstant 6 % (m/v), während das Trenngel, abhängig von den zu trennenden Proteingrößen, mit Acrylamid-Konzentrationen von 8 %, 10 %, 12,5 % oder 15 % (m/v) eingesetzt wurde. Der Molekulargewichtstandard bestand bei den 8 und 10 %-igen Gelen aus Myosin (205 kDa), β-Galaktosidase (116 kDa), Phosphorylase b (97,4 kDa), BSA (66 kDa), Ovalbumin (45 kDa) und Carboanhydrase (29 kDa); der

Standard für höherprozentige Gele enthielt BSA (66 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (36 kDa), Carboanhydrase (29 kDa), Trypsinogen (24 kDa), Sojabohnen-Trypsininhibitor (20 kDa) und Lactalbumin (14,2 kDa). Die Elektrophorese fand bei konstant 40 mA pro Gel für etwa 3 h statt. Proteine wurden mittels der Coomassie-Lösung angefärbt. Die Gele wurden teilweise bei 80°C im Vakuum getrocknet.

2× Sammelgelpuffer, pH 6,8

0,2 % (m/v) SDS  
250 mM Tris-HCl

2× Trenngelpuffer, pH 8,8

0,2 % (m/v) SDS  
750 mM Tris-HCl

Laufpuffer

1 % (m/v) SDS  
200 mM Glycin  
25 mM Tris

Coomassie-Lösung

1,4 g Serva-Blau R  
500 ml Methanol  
100 ml Essigsäure  
ad 1 l dH<sub>2</sub>O

Entfärbelösung

10 % (v/v) Essigsäure  
10 % (v/v) Methanol

### **3.3.16 Immunoblot** (Towbin *et al.*, 1979)

Die Gele wurden direkt auf eine Nitrocellulosemembran transferiert (über Nacht bei 4°C; 100 mA; ~20 V). Die auf die Nitrocellulosemembran transferierten Proteine wurden durch Ponceau S angefärbt, um sie an der Membran zu fixieren und um einen gleichmäßigen Gellauf zu gewährleisten. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran für 1 h in TBS mit 5 % (m/v) Magermilchpulver/BSA oder in einer Rotiblocklösung (1:10) inkubiert. Nach 3 x 15 min Waschen in TBS mit 0,2 % (m/v) Tween 20 (TBST) wurde die Membran mit den entsprechenden primären Antikörpern für mindestens 1 h inkubiert. Die Antikörper wurden in 50 ml TBS mit 500 µl Rotiblock verdünnt. Die Membran wurde dann 3 x 5 min in TBST gewaschen. Anschliessend erfolgte die Inkubation mit den entsprechenden Peroxidase-gekoppelten, sekundären Antikörpern (Verdünnungen 1:5.000 bis 1:100.000; 1 h). Die Membran wurde dann 3 x 5 min in TBST gewaschen. Schließlich wurde die Membran für 1 min mit ECL-Reagenz inkubiert.

Die Detektion der Chemolumineszenz-Reaktion erfolgte auf Kodak X-Omat-Filmen nach Expositionszeiten von 30 s bis 30 min.

<u>TBS, pH 7,4</u>		<u>TBST, pH 7,4</u>	
NaCl	150 mM	TBS	
Tris-HCl	10 mM	Tween 20	0,2% (m/v)
<u>Blotpuffer</u>		<u>Ponceau S-Lösung</u>	
Methanol	20 % (v/v)	Essigsäure	5 % (v/v)
SDS	0,01 % (m/v)	Ponceau S	0,1 % (m/v)
Glycin	300 mM		
Tris	40 mM		

### 3.4 Molekularbiologische Methoden

#### 3.4.1 Präparation von gesamtzellulärer RNA und mRNA

Die Isolierung von gesamtzellulärer RNA aus HEK-293-Zellen wurde mit dem RNeasy Mini Kit nach dem Protokoll für die Präparation tierischer Zellen durchgeführt. Zellen, die auf 35-mm-Schalen bis zur Konfluenz kultiviert worden waren, wurden nach Herstellerangaben präpariert. Die an einem Ionenaustauscher gebundene RNA wurde nach den Waschschritten mit 50 µl dH<sub>2</sub>O eluiert und das Eluat zur Lagerung bei -20°C eingefroren. Da die RNA-Präparate für den spezifischen Nachweis bestimmter mRNA-Spezies eingesetzt werden sollten, mussten sie frei von Kontaminationen mit genomischer DNA sein. Um dies zu gewährleisten, wurde aus der gesamtzellulären RNA die mRNA isoliert (Oligotex mRNA Kit). Dieser Reinigung liegt die Bindung der Poly-A-3'-Enden der mRNA-Moleküle an immobilisierte dC<sub>10</sub>T<sub>30</sub>-Oligonukleotide der Oligotex-Suspension zugrunde und ist hochspezifisch für mRNA. Gemäß den Herstellerangaben wurde die mRNA aus dem Gesamt-RNA-Präparat gereinigt, mit 30 µl dH<sub>2</sub>O vom Oligotex-Material eluiert und bei -20°C gelagert. Für RNA-Präparationen und anschließende Versuche wurde dH<sub>2</sub>O eingesetzt, in welchem RNAsen durch DEPC (Diethylpyrocarbonat)-Behandlung inaktiviert wurden (Sambrook & Russell, 2001). dH<sub>2</sub>O wurde über Nacht mit 0,1 % DEPC inkubiert und anschließend autoklaviert.

Durch die thermische Behandlung wurde das DEPC zu CO<sub>2</sub> und Ethanol hydrolysiert und somit aus dem Ansatz entfernt.

### 3.4.2 Präparation genomischer DNA

Hierfür wurden HEK-293-Zellen bis zur Konfluenz auf 35-mm-Schalen kultiviert. Nach Entfernen des Nährmediums wurde auf die Zellen 1 ml PBS gegeben und die Zellen mittels Zellschaber abgelöst. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (2.000 U/min; 5 min; RT) und das Sediment in 200 µl PBS resuspendiert. Anschliessend erfolgte der Zellaufschluss und die Reinigung der genomischen DNA nach Protokoll des QIAamp DNA Mini Kit „Blood and Body Fluid Spin Protocol“. Die genomische DNA wurde mit 150 µl dH<sub>2</sub>O eluiert und bei –20°C gelagert.

### 3.4.3 Reverse Transkription

Als Reverse Transkription (RT) wird die cDNA-Synthese von RNA-Matrizen bezeichnet, wobei ein gegensätzlich orientiertes Oligonukleotid als Primer fungiert. Diese Reaktion wird durch RNA-abhängige DNA-Polymerasen (reverse Transkriptasen) katalysiert. Als reverse Transkriptase wurde standardmäßig *Superscript II* eingesetzt und alle Reaktionsschritte wurden in dem Thermocycler *Tpersonal* durchgeführt.

Die RNA-Lösung (2,0 - 5,0 µl mRNA-Lösung), der spezifische Primer (20 pmol) und dNTP-Mix (20 mM) wurden mit dH<sub>2</sub>O auf 12,0 µl aufgefüllt und gemischt. Nach Denaturierung der RNA (65°C; 5 min) wurden 4,0 µl Erststrangpuffer, 2,0 µl DDT und 1,0 µl des RNase-Inhibitors RNAsin (40 u/µl) in den Ansatz pipettiert und für 2 min bei 42°C inkubiert. Durch Zugabe von 1,0 µl *Superscript II* (200 u/µl) erfolgte die Erststrangsynthese (42°C; 50 min). Anschliessend wurde die Polymerase thermisch inaktiviert (70°C; 10 min) und die einzelsträngige cDNA bei –20°C gelagert. In folgenden PCR-Ansätzen wurden 2,0 µl des RT-Ansatzes eingesetzt.

<u>Standard-RT</u>	RNA-Lösung	0,01 – 1,0 µg RNA
	Oligonukleotid (20 pM)	1,0 – 5,0 µl
	dNTP-Mix (20 mM)	1,0 µl
	dH <sub>2</sub> O	ad 12,0 µl

Inkubation: 65°C; 5 min  
 Erststrangpuffer (5 x)      4,0 µl  
 DTT (100 mM)              2,0 µl  
 RNAsin (40 U/µl)          1,0 µl  
 Inkubation: 42°C; 2 min  
*Superscript II* (200 U/µl)   1,0 µl  
 Inkubation: 42°C; 50 min  
 Inkubation: 70°C; 10 min

### 3.4.4 Polymerasekettenreaktion

Zur Synthese und Klonierung von DNA-Fragmenten mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde das Expand™ High Fidelity PCR System eingesetzt, das die zwei thermostabilen DNA-abhängigen DNA-Polymerasen *Taq* und *Pwo* enthält. Durch deren Kombination wird die hohe Syntheserate der *Taq*-Polymerase mit der Korrekturaktivität der *Pwo*-Polymerase verbunden. Der qualitative Nachweis von DNA, z.B. bei der qualitativen RT-PCR, wurde mit der *Taq*-Polymerase allein erbracht. Die Reaktion wurde in einem Thermocycler durchgeführt, wobei sich die Temperaturführung nach der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments und nach der Schmelztemperatur der eingesetzten Primer richtete.

Das Temperaturprogramm begann mit einer initialen Denaturierung der Ziel-DNA für 2 min bei 94°C. Nach der Denaturierung der DNA-Matrize (94°C; 30 sec) folgte das Annealing der Primer (30 sec). Die Annealingtemperatur richtete sich nach der Basenzusammensetzung der Primer und wurde nach der Formel  $T_m = (4^\circ\text{C} \times \text{G/C} + 2^\circ\text{C} \times \text{A/T}) - 5^\circ\text{C}$  berechnet. Die Elongationsreaktion lief bei 72°C und dauerte je nach Länge der Amplifikate bis zu 2 min, wobei eine Syntheserate von 1000 bp/min angenommen wurde. In der Regel reichten 30 Reaktionszyklen aus, um eine ausreichende Menge an PCR-Produkt zu amplifizieren.

#### Standard-PCR

Polymerase-Puffer (10x)	5,0 µl
dNTP Mix (25 mM)	1,0 µl
Primer Forward (20 pM)	1,0 µl
Primer Revers (20 pM)	1,0 µl
Ziel-DNA	0,01 µg – 0,5 µg

#### Standard-PCR-Programm

Start: 94°C 2 min	
94°C 30 s	} 30 Zyklen
X°C 30 s	
72°C 1 min	
72°C 7 min	



Polymerase (1 u/μl)	1,0 μl
dH <sub>2</sub> O	ad 50 μl

### 3.4.5 Ortsgerichtete Mutagenese

Durch ortsgerichtete Mutagenese können gezielt Basenpaare in einer DNA-Sequenz ausgetauscht werden. Durch diese Nukleotidsubstitutionen lassen sich einzelne Aminosäuren des Genprodukts gezielt mutieren und so die biophysikalischen und biochemischen Eigenschaften des Proteins untersuchen. Diese Methode beruht darauf, dass bei einer PCR zwei komplementäre Primer eingesetzt werden, die mittig die fehlpaarenden Nukleotide der Mutation tragen. Während der PCR wird das gesamte Konstrukt amplifiziert, so dass nach Hybridisierung und Ligation der komplementären Einzelstränge DNA vorliegt, die sich nur in der gewünschten Mutation von der ursprünglichen Sequenz unterscheidet. Für die PCR wurde mit *PfuTurbo* eine Polymerase benutzt, die PCR-Fragmente bis über 10 kb synthetisieren kann.

<u>Ortsgerichtete Mutagenese</u>		<u>Programm</u>	
<i>Pfu</i> -Puffer (10x)	5,0 μl	95°C 1 min	
dNTP-Mix (25 mM)	2,5 μl	95°C 30 s	} 15 Zyklen
Ziel-DNA	0,01 μg – 0,1 μg	72°C 1 min	
Primer Forward (20 pM)	1,5 μl	68°C 8 min	
Primer Revers (20 pM)	1,5 μl	68°C 10 min	
<i>PfuTurbo</i> (2,5 U/μl)	1,0 μl		
dH <sub>2</sub> O	ad 50 μl		

Nach der PCR lag im Ansatz ein Gemisch aus linearer DNA mit der gewünschten Mutation und der parenteralen, also nicht-mutierten Ziel-DNA vor. Zur Selektion der modifizierten DNA wurde der PCR-Ansatz mit der Restriktionsendonuklease *Dpn* I verdaut. Dieses Enzym besitzt die Erkennungssequenz 5'-GATC-3', welche in einer beliebigen DNA-Sequenz statistisch betrachtet alle 4<sup>4</sup> bp vorkommt. Die Besonderheit von *Dpn* I ist, dass ausschließlich Erkennungssequenzen gespalten werden, bei denen der Adenosinrest methyliert ist (G<sup>m</sup>ATC). Diese Eigenschaft wurde zur Differenzierung zwischen nicht-mutierter und mutierter DNA genutzt: Die parenterale Plasmid-DNA mit der Wildtyp-

Sequenz wurde während der Amplifizierung in *E. Coli* methyliert und somit von *Dpn* I verdaut. Die PCR-Produkte mit der Mutation dagegen stammen aus einer *in vitro* Reaktion und sind nicht methyliert. Durch die *Dpn* I-Spaltung wird also spezifisch die parenterale Ziel-DNA in kurze Fragmente abgebaut, während die mutierten DNA-Stränge erhalten bleiben.

Während der Ligationsreaktion hybridisieren die komplementären Einzelstränge, die die Mutation tragen, und werden zu einem zirkulären DNA-Plasmid verknüpft. Dieses Plasmid wurde nach Transformation in *E. Coli*-Zellen vermehrt, während die linearen Spaltprodukte der parenteralen DNA nicht amplifiziert werden konnten.

### 3.4.6 Restriktion von DNA

Die Restriktionen wurden als Standardmethoden durchgeführt und orientierten sich bezüglich Pufferzusammensetzung, Temperatur, Inkubationszeit, Enzymkonzentration und Zusatz von BSA an den Herstellerangaben. Für Testspaltungen wurden 0,1 – 0,5 µg DNA, für die Präparation von DNA-Fragmenten 1,0 – 3,0 µg DNA eingesetzt. Spaltungen von DNA-Fragmenten mit zwei unterschiedlichen Restriktionsenzymen erfolgten als Doppelverdau mit beiden Enzymen. Im Anschluss an die Spaltung wurde die DNA mittels Agarosegelelektrophorese analysiert.

### 3.4.7 Agarosegelelektrophorese von DNA

Sowohl zur Größenanalytik als auch Präparation gespaltener Fragmente wurde DNA im Agarosegel elektrophoretisch getrennt. Hierbei kamen in der Regel 1%ige Gele zum Einsatz. Die Agarose wurde in TBE-Puffer gelöst und nach der Polymerisation konnten Proben mit 20% 6x Loading Dye Solution aufgetragen werden. Die Trennung erfolgte bei 100 V mit TBE-Puffer als Laufpuffer. Durch nachfolgende Färbung in Ethidiumbromid (1,0 µl/ml), welches mit DNA einen Komplex bildet, der bei UV-Licht (314 nm) sichtbar wird, konnte die DNA nachgewiesen und durch Videodruck dokumentiert werden.

<u>TBE-Puffer 10x</u>	Tris-HCl	380 mM
	Borsäure	0,5 M
	EDTA	12 mM

### **3.4.8 Präparation und Reinigung von DNA-Fragmenten**

#### **Präparation von DNA-Fragmenten nach Agarosegelelektrophorese**

Zur Präparation von DNA-Fragmenten wurden bis zu 50 µl eines Restriktions- oder PCR-Ansatzes durch Agarosegelelektrophorese getrennt. Die DNA-Bande der gewünschten Größe wurde auf einem UV-Unterlichttisch aus dem Gel geschnitten und die DNA-Fragmente aus dem Gelstück eluiert.

Mit dem QIAquick Gel Extraction Kit wurde das Gelstück gelöst und die DNA-Fragmente an einen Anionenaustauscher gebunden und gewaschen. Das Gelstück wurde nach der Zugabe von etwa dem dreifachen Volumen QG-Puffer bei 50°C gelöst und nach Angaben des Herstellers aufgearbeitet. Nach Elution der DNA mit 30 bis 50 µl dH<sub>2</sub>O wurde die Präparation in einem Agarosegel elektrophoretisch analysiert und konnte direkt für Ligationsreaktionen eingesetzt werden.

#### **Reinigung von DNA-Fragmenten durch Extraktion**

Durch Phenol/Chloroform-Extraktion und anschliessender Ethanolfällung wurden Proteine und niedermolekulare Substanzen effektiv aus DNA-Lösungen entfernt. Die DNA-Lösung wurde mit 1 Volumen Phenol versetzt, gemischt und durch Zentrifugation (13.000 U/min; 5 min; Raumtemperatur) wässrige und organische Phase getrennt. Die wässrige Phase wurde abgenommen und mit 1 Volumen Chloroform extrahiert. Die Trennung der Chloroformphase von der wässrigen Phase erfolgte durch einen weiteren Zentrifugationsschritt (13.000 U/min; 2 min; RT). Die Chloroformextraktion wurde zweimal durchgeführt und Reste der organischen Lösungsmittel durch anschließende Ethanolfällung aus den Ansätzen entfernt.

Zur Ethanolfällung wurde die DNA-Lösung mit 0,1 Volumen LiCl (4,0 M) und 2,5 Volumen Ethanol (98 %) versetzt, vorsichtig gemischt und bei –70°C eingefroren. Nach dem Auftauen des Ansatzes auf Eis wurde die DNA durch Zentrifugation sedimentiert (13.000 U/min; 10 min; 4°C) und der Überstand vorsichtig abgenommen. Das Sediment wurde mit Ethanol (70 %) gewaschen und der Überstand nach Zentrifugation (13.000 U/min; 1 min; 4°C) abgenommen. Anschliessend wurde das DNA-Sediment an der Luft getrocknet und in 30 bis 50 µl dH<sub>2</sub>O resuspendiert.

### 3.4.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde mit der Ligase des Phagen T4 durchgeführt. Das Molverhältnis von Insert zu Vektor betrug etwa 3:1 und wurde im Agarosegel abgeschätzt. Die Lösungen der beiden DNA-Fragmente wurden mit 2,0 µl Ligasepuffer, 0,5 µl Ligase (3 u/µl) und dH<sub>2</sub>O auf 20 µl aufgefüllt und über Nacht bei 16°C inkubiert.

### 3.4.10 Transformation kompetenter Bakterienzellen

(Asubel *et al.*, 1989; Sambrook *et al.*, 1989)

#### Transformation

Ein 50 µl Aliquot kompetenter *E. Coli*-Bakterien wurde auf Eis aufgetaut, für 20 min mit 2 – 20 µl eines Ligationsansatzes inkubiert und für 90 s einem Hitzeschock (42°C) ausgesetzt. Nach Abkühlung der Transformationsansätze auf Eis wurden die Zellen mit 200 µl SOC-Medium inkubiert (37°C; 45 min) und bis zu 100 µl dieser Zellsuspension auf ampicillinhaltigen LB-Platten ausplattiert. Die vereinzelt Zellen wurden dann über Nacht bei 37°C bebrütet.

#### Elektroporation

Bei der Elektroporation wird durch kurze Hochspannungspulse die bakterielle Zellhülle poriert, und DNA kann in die Zelle gelangen. Zu 10 – 20 µl elektrokompenten *E. Coli*-Bakterien wurden 0,5 – 3,0 µl einer DNA-Lösung gegeben und der Ansatz in eine Elektroküvette überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 4Ω und 350 V. Anschliessend fügte man zu den Zellen 200 µl SOC-Medium hinzu und inkubierte 1 h bei 37°C. Der vollständige Ansatz wurde auf einer ampicillinhaltigen LB-Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet.

### 3.4.11 DNA-Präparation aus Bakterienzellen

#### Minipräparation von Plasmid-DNA

Zur raschen Präparation von Plasmidkonstrukten in kleinem Maßstab wurden einzelne Kolonien der auf der LB-Platte gewachsenen Bakterientransformanten in 3 ml LB überführt und über Nacht bei 37°C in einem Rotationsschüttler (160 U/min) inkubiert. Jeweils 1,5 ml der Schüttelkulturen wurden zentrifugiert (8000 U/min; 5 min; Raumtemperatur) und das Sediment in 200 µl Lösung P1 resuspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe von 200 µl Lösung P2. Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und für mindestens 3 min bei Raumtemperatur inkubiert, bis die Zellsuspension klar erschien. Anschließend wurden Begleitproteine, Zelltrümmer und chromosomale DNA gefällt, indem 200 µl Lösung P3 in den Ansatz gegeben und für 5 min auf Eis inkubiert wurde. Die gefällte Fraktion wurde sedimentiert (13.000 U/min; 5 min; RT) und der plasmidhaltige Überstand in 500 µl Isopropanol überführt, gemischt und bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert. Durch Zentrifugation (13.000 U/min; 7 min; RT) wurde die gefällte DNA sedimentiert und der Überstand sorgfältig entfernt. Das DNA-Sediment wurde für 10 min an der Luft getrocknet, in 30 bis 50 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert und bei –20°C gelagert.

<u>P1</u>	<u>P2</u>	
Tris-HCl (pH 8,0)	50 mM NaOH	200 mM
EDTA	10 mM SDS	1% m/v
Rnase A	100 µg/ml	

<u>P3</u>	
Kaliumacetat (pH 5,5)	3 M

#### Präparation von Plasmid-DNA (Birnboim & Doly, 1979)

Zur Präparation und Reinigung von Plasmid-DNA in großem Maßstab wurden 3 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie des Plasmid-tragenden Bakterienstammes angeimpft und für ca. 8 h bei 37°C im Rotationsschüttler mit 160 U/min inkubiert. Anschliessend wurde diese Vorkultur in 1,0 – 1,5 l ampicillinhaltiges LB-Medium überführt und über Nacht unter den gleichen Bedingungen wie oben beschrieben kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Bakterien mit 6.000 U/min bei 4°C für 15 min

sedimentiert. Die Reinigung der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des Plasmid Mega Kit (Qiagen), wobei die Bakterien nach Resuspension in einer NaOH/SDS-haltigen Lösung zunächst alkalisch lysiert wurden. Das Lysat wurde dann unter angepassten Bedingungen (pH 7,0 und niedrige Salz-Konzentrationen) auf ein Anionenaustauscherharz aufgetragen. RNA, Proteine und Unreinheiten wurden daraufhin durch eine höherkonzentrierte Salzlösung von der Säule entfernt. Schließlich wurde die Plasmid-DNA mit einer hochkonzentrierten Salzlösung eluiert, durch 70 % Ethanol präzipitiert und in 700 µl TE-Puffer resuspendiert.

<u>TE-Puffer, pH 8,0</u>	EDTA	1 mM
	Tris-HCl	10 mM

#### 3.4.12 Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen

Die Konzentrationen der RNA- / DNA-Lösungen wurden durch UV-Spektrophotometrie in Quarzküvetten bei 260 nm bestimmt und nach folgenden Formeln berechnet:

DNA (µg/µl):  $0,05 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Extinktion}_{260 \text{ nm}}$

RNA (µg/µl):  $0,04 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Extinktion}_{260 \text{ nm}}$

#### 3.4.13 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzen von PCR-Produkten wurden durch Sequenzierung überprüft (gatc Biotech).

### 3.4 Datenauswertung

Die Graphiken wurden mit Hilfe des Computerprogramms GraphPadPrism (Version 3.02, 2000) erstellt. Alle Versuche wurden, soweit nicht anders angegeben, in Dreifachbestimmungen durchgeführt. Dargestellt wurden Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen von  $n$  unabhängigen Versuchen. Immunoblotbanden wurden mit der ImageQuant Software (Molecular Dynamics) densitometrisch quantifiziert. Zur statistischen Auswertung der Daten wurde entweder der *Student's paired t test* oder *one-way Anova* verwendet. Nukleinsäuresequenzen wurden mit Hilfe von BioEdit (Version 5.0.9) ausgewertet.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 durch den $\beta_2$ -Adrenozeptor in HEK-293-Zellen: Basale Parameter

Die Stimulation vieler G-Protein-gekoppelter Rezeptoren führt zur Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1 und ERK2, die nachfolgend eine Vielzahl zellulärer Prozesse wie Zellwachstum und -differenzierung entscheidend beeinflussen können (Gutkind, 2000; Pearson *et al.*, 2001; Johnson & Lapadat, 2002). Eine einzigartige Rolle spielen hierbei die  $G_s$ -gekoppelten Rezeptoren, deren Aktivierung primär zu einer vermehrten Bildung von cAMP durch die AC führt. In einer großen Zahl zellulärer Systeme hemmen diese Rezeptoren die Aktivierung von ERK1/2 durch Wachstumsfaktoren. Dagegen findet man insbesondere in neuronalen und endokrinen Zellen meistens eine Aktivierung dieser MAP-Kinasen durch  $G_s$ -gekoppelte Rezeptoren (Stork & Schmitt, 2002).

Für die Aktivierung von ERK1/2 durch  $G_s$ -gekoppelte Rezeptoren wurden von den Arbeitsgruppen Lefkowitz und Stork zwei unterschiedliche Mechanismen erarbeitet, wobei interessanterweise beide Arbeitsgruppen die Aktivierung von ERK1/2 durch den  $\beta_2$ -Adrenozeptor ( $\beta_2$ -AR), ein typischer Vertreter  $G_s$ -gekoppelter Rezeptoren in HEK-293-Zellen untersuchten (Lefkowitz *et al.*, 2002; Stork & Schmitt, 2002). Wie in der Einleitung dargestellt (s. 2.4), erfolgt die Aktivierung von ERK1/2 durch den  $\beta_2$ -AR gemäß der Hypothese von Lefkowitz und Mitarbeitern zunächst dadurch, dass durch die vermehrte Bildung von cAMP durch die AC die PKA aktiviert wird, die dann den Rezeptor phosphoryliert, wodurch er seine Kopplung von  $G_s$  nach  $G_i$  ändert. Aus den aktivierten  $G_i$ -Proteinen werden in der Folge  $G\beta\gamma$ -Dimere freigesetzt, die dann über Aktivierung der Tyrosinkinase c-Src zur Aktivierung von Ras führen, das dann die Raf-1-Kinase aktiviert und schlussendlich in die Aktivierung von ERK1 und ERK2 mündet (Daaka *et al.*, 1997; Lefkowitz *et al.*, 2002). Dagegen zeigten Stork und Schmitt, dass der  $\beta_2$ -AR unabhängig von einer Kopplung an  $G_i$ -Proteine über die PKA und c-Src zu einer Aktivierung von ERK1/2 führt und dass anstelle von Ras und Raf-1 Rap1 und B-Raf als Initiatoren der Aktivierung von ERK1/2 fungieren (Schmitt & Stork, 2000; Schmitt & Stork, 2002a). Trotz der

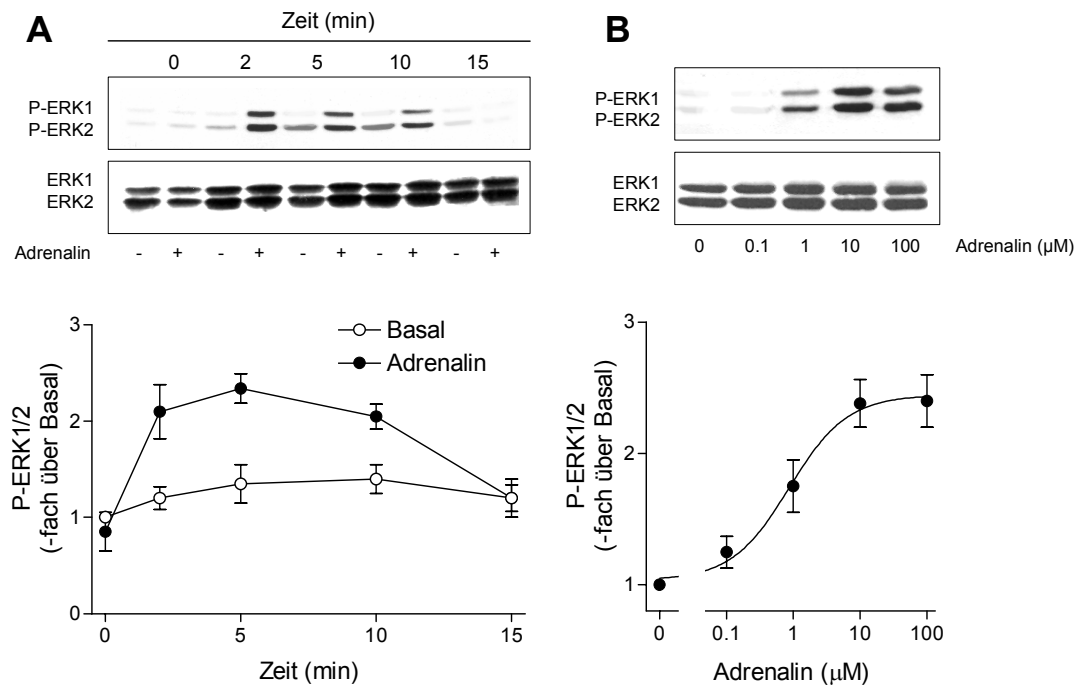
Unterschiede ist beiden Modellen gemeinsam, dass die Aktivierung von ERK1/2 durch den  $\beta_2$ -AR die PKA benötigt.

In jüngster Zeit gab es jedoch verschiedene Berichte, dass  $G_s$ -gekoppelte Rezeptoren über cAMP, jedoch unabhängig von der PKA zur Aktivierung von ERK1/2 führen können (Iacovelli *et al.*, 2001; Fujita *et al.*, 2002). Zudem war gezeigt worden, dass cAMP ohne Beteiligung der PKA zur Aktivierung von Ras führen kann (Buscá *et al.*, 2000). In unserer Arbeitsgruppe wurde vor kurzem ein neuer cAMP-abhängiger Signalweg für  $G_s$ -gekoppelte Rezeptoren beschrieben, der ebenfalls ohne Beteiligung der PKA ablief. Eine Stimulation des in HEK-293-Zellen transient exprimierten  $\beta_2$ -ARs und des in N1E-115-Neuroblastomzellen endogen exprimierten PGE<sub>1</sub>-Rezeptors führte zu einer cAMP-abhängigen Aktivierung der PLC- $\epsilon$  und nachfolgenden  $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung. Das Signal wurde nicht durch die PKA, sondern durch cAMP-aktivierte Epac-Proteine (de Rooij *et al.*, 1998; Kawasaki *et al.*, 1998; Bos, 2003) und nachfolgende Aktivierung der GTPase Rap2B vermittelt (Schmidt *et al.*, 2001; vom Dorp *et al.*, 2004). Es stellte sich deshalb die Frage, ob dieser Signalweg zu einer Aktivierung von ERK1/2 durch  $G_s$ -gekoppelte Rezeptoren führen kann. Falls die Existenz eines solchen Signalweges nachweisbar wäre, sollten die beteiligten molekularen Mechanismen aufgeklärt werden. Zunächst wurde jedoch geprüft, ob und inwieweit die von Lefkowitz und Mitarbeitern bzw. von Stork und Schmitt identifizierte Komponenten, nämlich cAMP, PKA,  $G_i$ -Proteine,  $G\beta\gamma$ -Dimere, c-Src, Rap1 und H-Ras, auch in unseren Händen bei der Aktivierung von ERK1/2 durch den  $\beta_2$ -AR in HEK-293-Zellen beteiligt sind.

Im Unterschied zu den von Daaka *et al.* (1997) und Schmitt und Stork (2000) benutzten HEK-293-Zellen exprimierten die von uns für unsere Untersuchungen eingesetzten HEK-293-Zellen endogen keine  $\beta_2$ -ARen, wie frühere Untersuchungen bereits gezeigt hatten (Schmidt *et al.*, 2001). Während wir also in untransfizierten HEK-293-Zellen keine ERK-Aktivierung nach Zugabe des  $\beta_2$ -AR-Agonisten Adrenalin beobachteten (nicht gezeigt), führte die Zugabe von Adrenalin zu Zellen, die den Rezeptor transient exprimierten, zu einer zeit- und konzentrationsabhängigen Phosphorylierung, d.h. Aktivierung von ERK1 und ERK2 (Abb. 6). Der stimulatorische Effekt von Adrenalin war schnell und transient. Eine maximale ERK-Aktivierung wurde nach 2-5 min beobachtet, und bereits nach 15 min war diese Aktivierung nicht mehr detektierbar (Abb. 6A). Eine halbmaximale und maximale

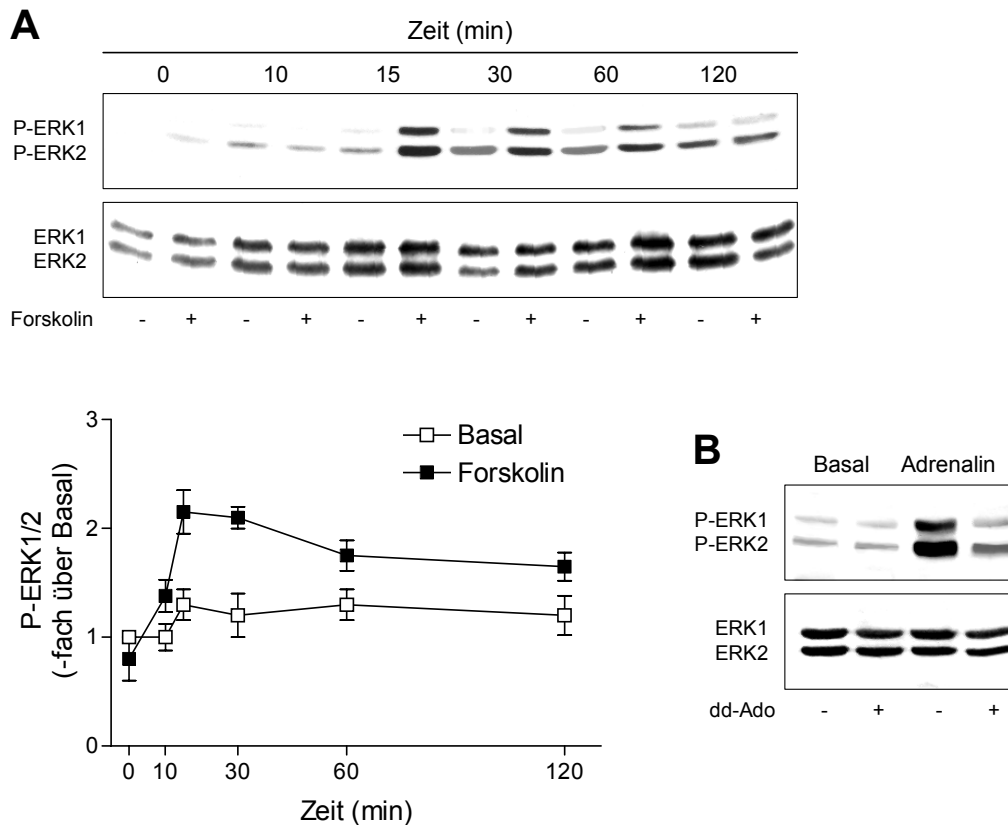


Aktivierung von ERK1/2 wurde bei  $\sim 1 \mu\text{M}$  und  $\sim 10 \mu\text{M}$  Adrenalin beobachtet (Abb. 6B). Die stimulatorischen Effekte von Adrenalin ( $10 \mu\text{M}$ ) auf die ERK-Aktivierung wurden durch den  $\beta$ -AR-Antagonisten Propranolol ( $1 \mu\text{M}$ ) komplett blockiert (siehe Abb. 9). Zudem unterdrückte eine Vorbehandlung der Zellen mit den MAP-Kinase-Kinase-Hemmstoffen PD98059 ( $10 \mu\text{M}$ ) und U0126 ( $10 \mu\text{M}$ ) (English & Cobb, 2002) die Aktivierung von ERK1/2 durch Adrenalin vollständig (nicht gezeigt).



**Abb. 6: Aktivierung von ERK1 und ERK2 durch den  $\beta_2$ -AR.** HEK-293-Zellen wurden mit dem  $\beta_2$ -AR transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen für die angegebenen Zeiten ohne (*Basal*) und mit  $10 \mu\text{M}$  Adrenalin (**A**) oder für 5 min mit Adrenalin in den angegebenen Konzentrationen stimuliert (**B**). Anschließend wurde die Menge an phosphorylierten ERK1 (P-ERK1) und ERK2 (P-ERK2) mit einem phospho-spezifischen ERK-Antikörper und der Gesamtgehalt an ERK1 und ERK2 mit einem ERK-spezifischen Antikörper detektiert. Im oberen Teil der Abbildung sind jeweils typische Experimente dargestellt. Für die quantitative Auswertung der Daten ( $n = 3-6$ ) wurde der Gehalt an P-ERK1/2 in unstimulierten Zellen zu 1 gesetzt.

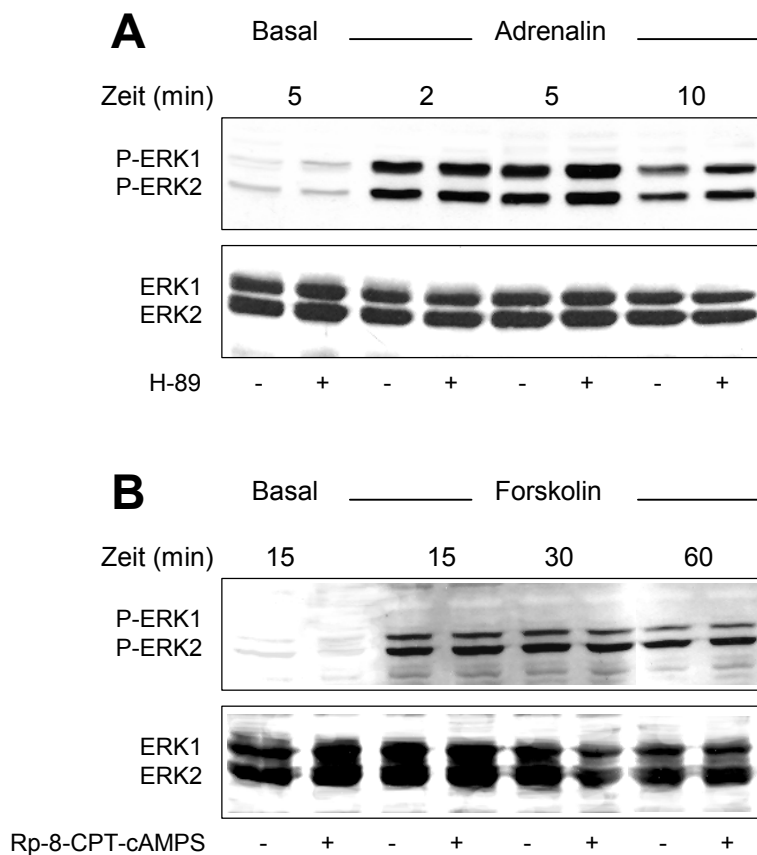
Die Signalweiterleitung von  $G_s$ -gekoppelten Rezeptoren erfolgt primär über eine Aktivierung von Isoformen der AC und somit eine Steigerung der intrazellulären cAMP-Konzentration. Um zu prüfen, ob die Aktivierung von ERK1/2 durch Adrenalin AC/cAMP-abhängig erfolgt, wurden zwei Strategien eingesetzt. Mitglieder der AC-Familie werden direkt unter Umgehung der Rezeptorebene durch das membrangängige Forskolin, ein Diterpen aus der Pflanze *Coleus forskohlii* aktiviert (Hanoune & Defer, 2001). Wie in der Abb. 7A zu erkennen ist, führte eine Behandlung der HEK-293-Zellen mit Forskolin zu einer deutlichen Aktivierung von ERK1 und ERK2. Die stimulatorische Wirkung von Forskolin, die bei einer Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  maximal war (nicht gezeigt), trat jedoch im Vergleich zu der des  $\beta_2$ -AR-Agonisten Adrenalin zeitlich verzögert ein und hielt länger an. Eine maximale Aktivierung wurde erst nach 15-30 min beobachtet und war noch 120 min nach Zugabe von Forskolin deutlich detektierbar (Abb. 7A). Falls die Aktivierung des ERK-Signalweges durch Adrenalin und Forskolin wirklich AC/cAMP-abhängig ist, sollte sie durch Hemmung der AC unterdrückbar sein. Mitglieder der AC-Familie werden durch 2',5'-Didesoxyadenosin (dd-Ado), einem direkten *P-site* AC-Inhibitor, durch Bindung an die ATP-Bindungsstelle gehemmt (Hanoune & Defer, 2001). Wie in der Abb. 7B dargestellt, hatte eine Vorbehandlung der Zellen mit dd-Ado (10  $\mu\text{M}$ ) keinen Einfluss auf die basale ERK-Aktivität. Dagegen wurde die Aktivierung von ERK1 und ERK2 durch Adrenalin (10  $\mu\text{M}$ ) um etwa 80 % reduziert ( $n = 4$ ;  $p < 0.001$ ). Eine ähnliche Hemmung durch dd-Ado wurde bei Aktivierung des ERK-Signalweges durch Forskolin beobachtet (nicht gezeigt). Insgesamt kann aus den bisher vorgestellten Daten also gefolgert werden, dass eine Stimulation des transient in HEK-293-Zellen exprimierten  $\beta_2$ -ARs zur Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 führt und dass diese Aktivierung offensichtlich von der Bildung von cAMP durch die AC abhängig ist.



**Abb. 7: Die Aktivierung von ERK1/2 durch den  $\beta_2$ -AR ist AC/cAMP-abhängig.**  $\beta_2$ -AR-exprimierende HEK-293-Zellen wurden für die angegebenen Zeiten ohne (*Basal*) und mit 30  $\mu$ M Forskolin stimuliert (**A**) oder mit 0,1 % (v/v) DMSO (-) und 10  $\mu$ M dd-Ado für 15 min vorbehandelt und anschliessend ohne (*Basal*) und mit 10  $\mu$ M Adrenalin stimuliert (**B**). Der Immunoblot im oberen Teil der Abb. **A** stellt ein typisches Experiment dar. Für die quantitative Auswertung der Daten ( $n = 3-6$ ) wurde der Gehalt an P-ERK1/2 in unstimulierten Zellen zu 1 gesetzt.

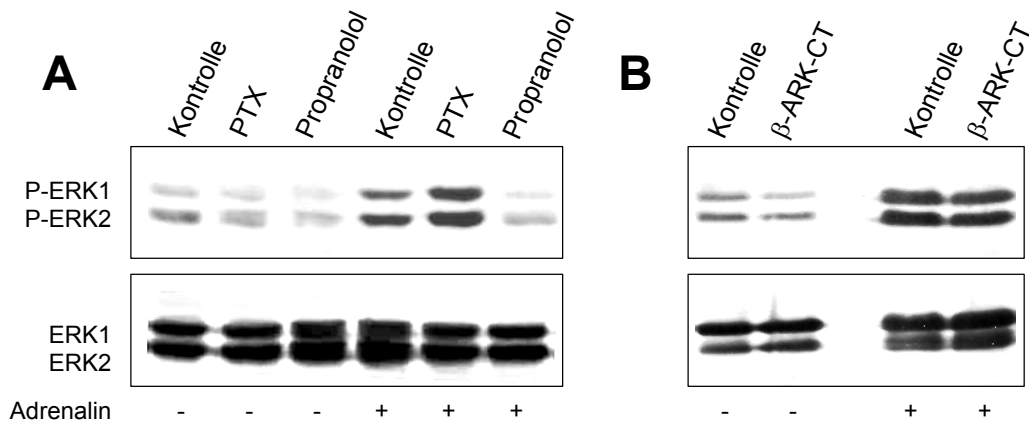
Als nächstes wurde nun geprüft, ob die cAMP-abhängige Aktivierung von ERK1/2 durch den  $\beta_2$ -AR durch Aktivierung der PKA vermittelt wird. Dafür wurden die beiden PKA-Inhibitoren H-89 und Rp-8-CPT-cAMPS eingesetzt (Chijiwa *et al.*, 1990; Gjertsen *et al.*, 1995). Wie in der Abb. 8A dargestellt, veränderte eine Vorbehandlung der Zellen mit H-89 (10  $\mu$ M) weder die basale noch die durch Adrenalin (10  $\mu$ M) stimulierten ERK1/2-Aktivitäten zu keinem Zeitpunkt der Messung. Ebenso hatte eine Vorbehandlung der Zellen mit Rp-8-CPT-cAMPS (10  $\mu$ M) keinen

Einfluss auf die basalen und durch Forskolin (30  $\mu$ M) stimulierten Aktivitäten von ERK1/2 (Abb. 8B). Die PKA-Inhibitoren waren jedoch nicht wirkungslos. Eine Vorbehandlung der HEK-293-Zellen mit H-89 und Rp-8-CPT-cAMPS unterdrückte komplett die durch Forskolin induzierte Phosphorylierung von VASP, einem direkten Substrat der PKA (Meinecke *et al.*, 1994; Schwarz *et al.*, 2001), das in diesen Zellen endogen exprimiert wird (nicht gezeigt). Im Gegensatz zu den Modellen von Lefkowitz und Stork scheint also in unserem System die PKA keine entscheidende Bedeutung für die Aktivierung von ERK1/2 durch den  $\beta_2$ -AR zu haben.



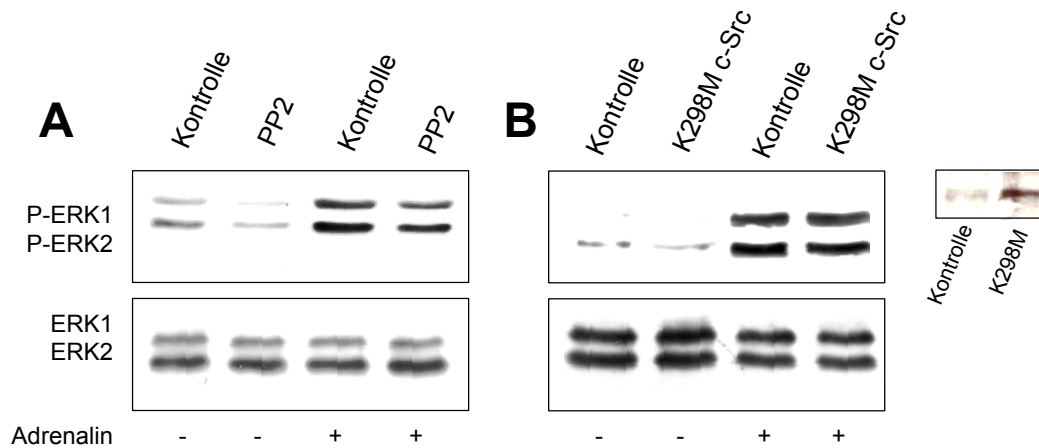
**Abb. 8: Fehlender Einfluss von PKA-Inhibitoren auf die Aktivierung von ERK1/2 durch Adrenalin und Forskolin.**  $\beta_2$ -AR-exprimierende HEK-293-Zellen wurden mit 0,1 % (v/v) DMSO (-), 10  $\mu$ M H-89 (**A**) oder 10  $\mu$ M Rp-8-CPT-cAMPS (**B**) für 15 min vorbehandelt. Anschließend wurden die Zellen für die angegebenen Zeiten ohne (*Basal*) und mit 10  $\mu$ M Adrenalin oder 30  $\mu$ M Forskolin stimuliert. Dargestellt sind typische Experimente ( $n = 3-4$ ).

Im Folgenden wurde nun untersucht, ob und inwieweit  $G_i$ -Proteine,  $G\beta\gamma$ -Dimere, c-Src, Rap1 und H-Ras in die cAMP-abhängige Aktivierung von ERK1/2 durch den  $\beta_2$ -AR eingeschaltet sind. Lefkowitz und Kollegen postulierten, dass durch eine PKA-abhängige Phosphorylierung des  $\beta_2$ -ARs dieser Rezeptor nun bevorzugt an  $G_i$ -Proteine koppelt, woraus in der Folge  $G\beta\gamma$ -Dimere freigesetzt werden (Daaka *et al.*, 1997; Lefkowitz *et al.*, 2002). Um diese Möglichkeit zu prüfen, wurden HEK-293-Zellen mit dem  $G_i$ -Protein-Hemmstoff PTX (100 ng/ml) vorbehandelt (Hall, 2000). Wie in der Abb. 9A dargestellt, hatte eine Vorbehandlung der Zellen mit PTX keinen Einfluss auf die basalen und durch Adrenalin stimulierten ERK1/2-Aktivitäten. Dies zeigte, dass die Aktivierung von ERK1/2 durch den  $\beta_2$ -AR nicht durch  $G_i$ -Proteine und wahrscheinlich auch nicht durch aus ihnen freigesetzte  $G\beta\gamma$ -Dimere vermittelt wird. Diese Schlussfolgerung wurde durch ein weiteres Experiment bestätigt. In den Zellen wurde der C-Terminus der  $\beta$ -Adrenozeptorkinase ( $\beta$ -ARK-CT), einem Sequester von  $G\beta\gamma$ -Dimeren (Koch *et al.*, 1994), exprimiert und nachfolgend die Aktivierung von ERK1/2 durch den  $\beta_2$ -AR untersucht. Eine Expression von  $\beta$ -ARK-CT veränderte weder die basale noch die durch Adrenalin stimulierten ERK1/2-Aktivitäten (Abb. 9B). Unter identischen Bedingungen unterdrückte jedoch eine Vorbehandlung der Zellen mit PTX und die Expression von  $\beta$ -ARK-CT die Aktivierung von ERK1/2 durch den endogen in HEK-293-Zellen exprimierten  $G_i$ -gekoppelten Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor (Meyer zu Heringdorf *et al.*, 2003; vom Dorp *et al.*, 2004; nicht gezeigt). Somit scheinen in unserem Modell weder PKA noch  $G_i$ -Proteine und aus ihnen freigesetzte  $G\beta\gamma$ -Dimere von Bedeutung für die Aktivierung von ERK1/2 durch den  $\beta_2$ -AR zu sein.



**Abb. 9: Fehlender Einfluss von  $G_i$ -Proteinen und  $G\beta\gamma$ -Dimeren auf die Aktivierung von ERK1/2 durch den  $\beta_2$ -AR.** HEK-293-Zellen wurden nur mit dem  $\beta_2$ -AR (Kontrolle) (A) oder zusammen mit  $\beta$ -ARK-CT (100  $\mu$ g cDNA) (B) transfiziert. Ein Teil der Zellen wurden für 16 h mit 100 ng/ml PTX vorbehandelt (A). Anschliessend wurden die Zellen für 5 min ohne (-) und mit 10  $\mu$ M Adrenalin in Ab- oder Anwesenheit von 1  $\mu$ M Propranolol stimuliert. Dargestellt sind typische Experimente der ERK1/2-Phosphorylierung ( $n = 3-5$ ).

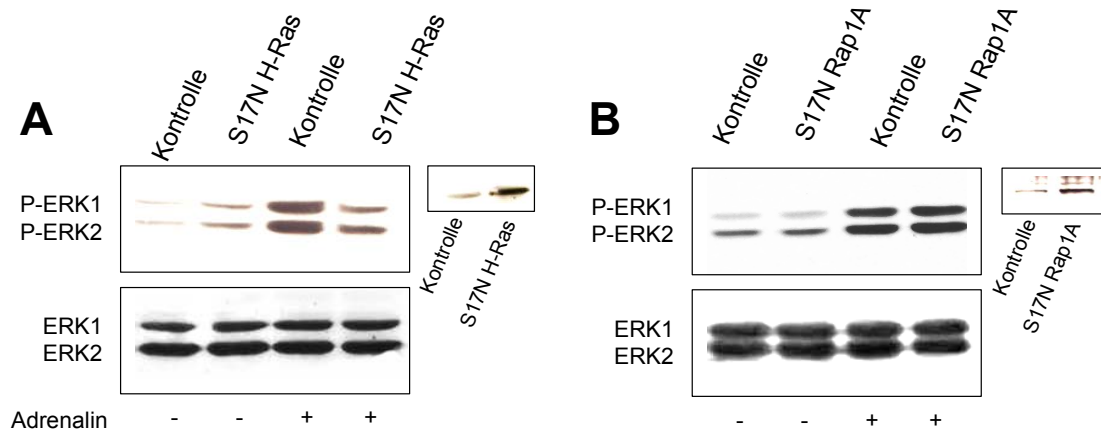
Die bislang etablierten Modelle der Aktivierung von ERK1/2 durch den  $\beta_2$ -AR weisen auf eine zentrale Rolle der zellulären Tyrosinkinase c-Src hin (Stork & Schmitt, 2002; Lefkowitz *et al.*, 2002). Um zu prüfen, ob die cAMP-abhängige Aktivierung von ERK1/2 durch den  $\beta_2$ -AR auch in unseren Zellen diese Tyrosinkinase benötigt, wurden zwei Strategien gewählt. Zum einen wurde geprüft, ob der c-Src-Inhibitor PP2 (Hanke *et al.*, 1996) die Aktivierung von ERK1/2 durch Adrenalin unterdrückt, und zum anderen wurde untersucht, ob durch Expression einer Kinase-defizienten c-Src-Mutante (K298M c-Src) dieser pharmakologische Ansatz bestätigt werden kann. Wie in der Abb. 10A dargestellt, reduzierte PP2 (10  $\mu$ M) sowohl die basale als auch die durch Adrenalin induzierte Aktivierung von ERK1/2 leicht, um etwa 30 % ( $n = 4$ ;  $p < 0.03$ ). Dagegen wurde durch die Expression der Kinase-defizienten c-Src-Mutante die ERK-Aktivierung durch Adrenalin nicht verändert (Abb. 10B). Diese c-Src-Mutante interferierte jedoch in diesen Zellen mit der Stimulation der PLC- $\epsilon$  durch den EGF-Rezeptor (Stope *et al.*, 2004). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass c-Src keine entscheidende Bedeutung für die ERK-Aktivierung durch den  $\beta_2$ -AR einnimmt und dass der geringe hemmende Effekt von PP2 wohl eher auf einer unspezifischen Wirkung auf andere Proteine beruht.



**Abb. 10: Rolle von c-Src für die Aktivierung von ERK1/2 durch den  $\beta_2$ -AR.** HEK-293-Zellen wurden nur mit dem  $\beta_2$ -AR (*Kontrolle*) (**A**) oder zusammen mit K298M c-Src (100  $\mu$ g cDNA) (**B**) transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen mit 0,1 % (v/v) DMSO (*Kontrolle*) oder mit 10  $\mu$ M PP2 (**A**) für 15 min vorbehandelt. Anschließend erfolgte die Stimulation für 5 min ohne (-) und mit 10  $\mu$ M Adrenalin. Dargestellt sind typische Experimente der ERK-Phosphorylierung ( $n = 3$ ). Inset: Nachweis der Expression von K298M c-Src.

Abschliessend wurde nun geprüft, welche Ras-ähnliche GTPase die cAMP-abhängige Aktivierung von ERK1/2 durch den  $\beta_2$ -AR vermittelt. Die Arbeitsgruppe um Stork zeigte, dass die Aktivierung von ERK1/2 durch den  $\beta_2$ -AR durch die Ras-ähnliche GTPase Rap1 vermittelt wird, die dann über Aktivierung von B-Raf zur Aktivierung von ERK1/2 führt (Schmitt & Stork, 2000; Schmitt & Stork, 2002a). Dagegen postulierten Lefkowitz und Kollegen, dass nach Stimulation des  $\beta_2$ -ARs unter Beteiligung von  $G\beta\gamma$ -Dimeren und c-Src H-Ras aktiviert wird, das dann über Raf-1 zur Aktivierung von ERK1/2 führt (Daaka *et al.*, 1997; Lefkowitz *et al.*, 2002). Es wurde deshalb untersucht, ob H-Ras oder Rap1 an der Aktivierung von ERK1/2 durch den  $\beta_2$ -AR in unseren Zellen beteiligt ist. Hierzu wurden die dominant negativen H-Ras- und Rap1A-Mutanten S17N H-Ras bzw. S17N Rap1A in den Zellen exprimiert. Wie in der Abb. 11A dargestellt, unterdrückte eine Expression von S17N H-Ras die Aktivierung von ERK1/2 durch Adrenalin und Forskolin (nicht gezeigt) um etwa 80 % ( $n = 5$ ;  $p < 0.008$ ). Dagegen hatte eine Expression von S17N Rap1A keinerlei Einfluss auf die ERK-Aktivierung durch den  $\beta_2$ -AR (Abb. 11B). Die Expression von S17N Rap1A unterdrückte dagegen die Aktivierung von endogen in

HEK-293-Zellen exprimiertem Rap1A durch den EGF-Rezeptor (Stope *et al.*, 2004; nicht gezeigt). Zur Beantwortung der Frage, ob Raf-1 und/oder B-Raf in die ERK-Aktivierung durch den  $\beta_2$ -AR eingeschaltet sind, wurden die Aktivitäten von Raf-1 und B-Raf *in vitro* in Immunpräzipitaten von Lysaten Adrenalin-stimulierter Zellen untersucht. Die bisherigen vorläufigen Ergebnisse (nicht gezeigt) lassen noch keine abschließende Aussage zu, welche dieser beiden Raf-Kinasen in die ERK-Aktivierung durch den  $\beta_2$ -AR eingeschaltet ist. Zusammenfassend kann also festgehalten werden, dass für die Aktivierung von ERK1/2 durch den  $\beta_2$ -AR in den von uns untersuchten HEK-293-Zellen offensichtlich cAMP und H-Ras, nicht jedoch PKA,  $G_i$ -Proteine,  $G\beta\gamma$ -Dimere, c-Src oder Rap1A von zentraler Bedeutung sind.

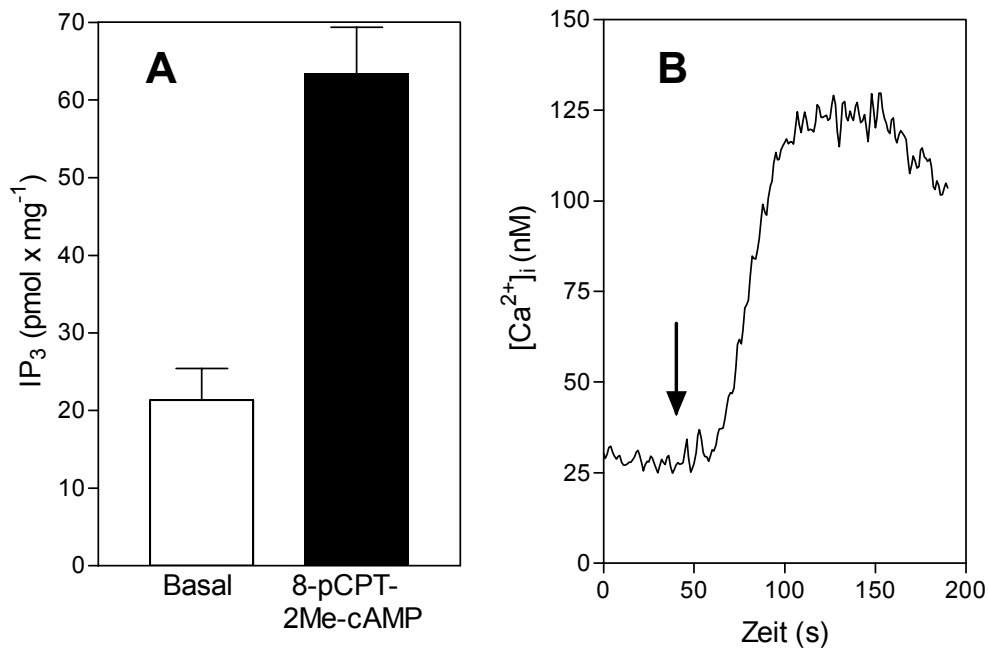


**Abb.11: Beteiligung von H-Ras, nicht jedoch von Rap1A, an der Aktivierung von ERK1/2 durch den  $\beta_2$ -AR.** HEK-293-Zellen wurden nur mit dem  $\beta_2$ -AR (Kontrolle) oder zusammen mit S17N H-Ras (A) oder S17N Rap1A (jeweils 100  $\mu$ g cDNA) (B) transfiziert. Anschließend wurden die Zellen ohne (-) und mit 10  $\mu$ M Adrenalin für 5 min stimuliert. Dargestellt sind typische Experimente der ERK-Phosphorylierung ( $n = 3-5$ ). Insets: Nachweis der Expression von S17N H-Ras und S17N Rap1A.



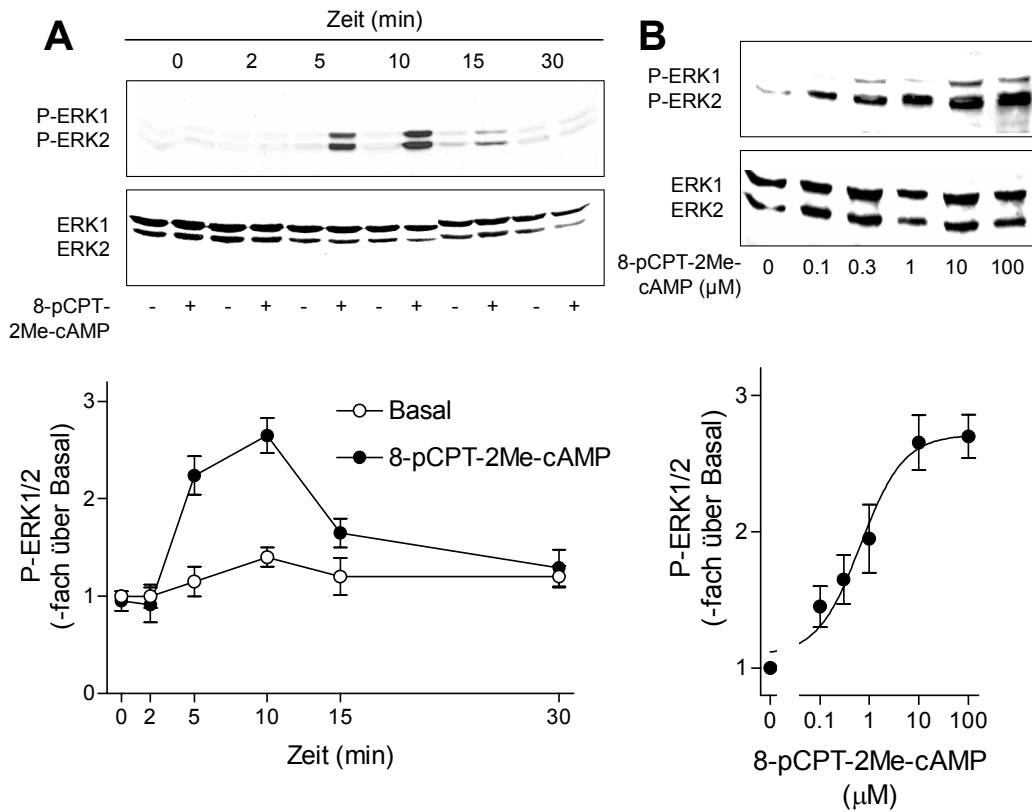
## 4.2 Aktivierung von ERK1/2 und H-Ras durch den $\beta_2$ -AR: Rolle von Epac-Proteinen und Rap2B

Die Aktivierung von ERK1/2 durch den  $\beta_2$ -AR erfolgte cAMP-abhängig, jedoch offensichtlich ohne Beteiligung der PKA. Unsere Arbeitsgruppe hatte in den letzten Jahren zeigen können, dass Epac-Proteine, neue direkte cAMP-Effektoren (Bos, 2003; Springett *et al.*, 2004), in diesen Zellen durch eine cAMP-abhängige Aktivierung von Rap2B in die Regulation von PLC- und  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen eingreifen (Schmidt *et al.*, 2001; Evellin *et al.*, 2002; Stope *et al.*, 2004; vom Dorp *et al.*, 2004). Die bisher vorgestellten Ergebnisse zur ERK-Aktivierung ließen deshalb mutmassen, dass Epac-Proteine auch für die Aktivierung von ERK1/2 durch den  $\beta_2$ -AR relevant sind. Um dies zu prüfen, wurde 8-pCPT-2Me-cAMP als direkter Epac-Aktivator (siehe Abb. 4) eingesetzt. Dieses membrangängige cAMP-Analog aktiviert spezifisch Epac-Proteine, nicht jedoch die PKA (Enserink *et al.*, 2002). Zunächst wurde geprüft, ob eine direkte Aktivierung von Epac-Proteinen durch 8-pCPT-2Me-cAMP zu einer Steigerung von PLC- und  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen führen kann. Wie in der Abb. 12A dargestellt, führte eine Zugabe von 8-pCPT-2Me-cAMP (10  $\mu\text{M}$ ) zu HEK-293-Zellen zu einer gesteigerten Bildung von  $\text{IP}_3$ , dem direkten PLC-Reaktionsprodukt. Erwartungsgemäß war diese  $\text{IP}_3$ -Bildung von einer Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) auf maximal  $135 \pm 25 \text{ nM}$  ( $n = 6$ ) begleitet (Abb. 12B). Hingegen führte 8-pCPT-2Me-cAMP nicht zu einer Phosphorylierung von VASP in diesen Zellen (nicht gezeigt). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass durch direkte Aktivierung von Epac-Proteinen (durch 8-pCPT-2Me-cAMP) PLC- und  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in HEK-293-Zellen stimuliert werden können.



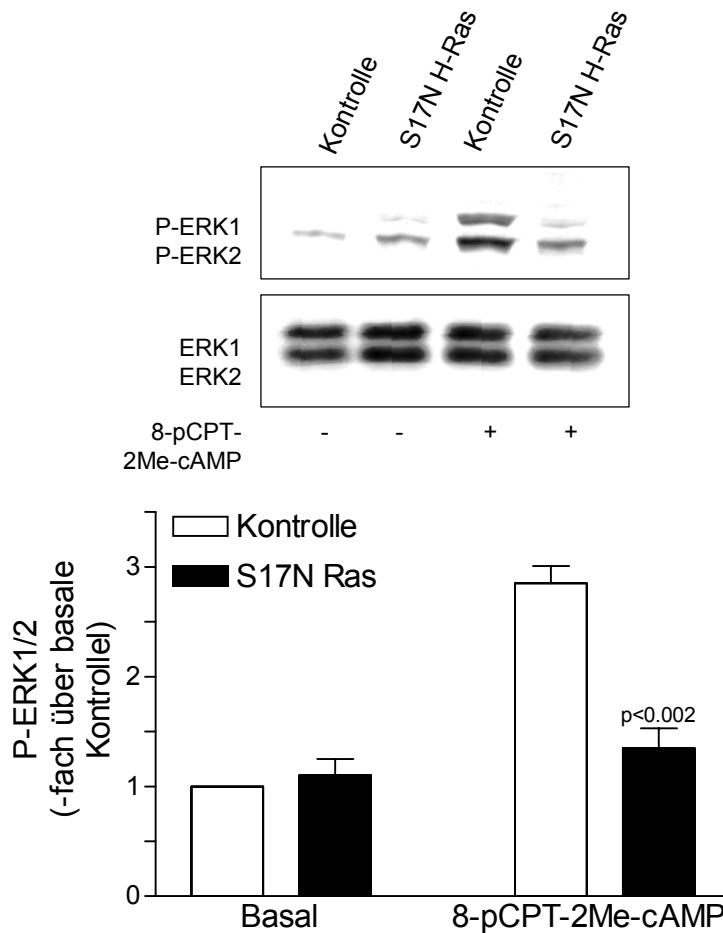
**Abb. 12: PLC-Stimulation und  $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung durch 8pCPT-2Me-cAMP.** In  $\beta_2$ -AR-exprimierenden HEK-293-Zellen wurde die IP<sub>3</sub>-Bildung ohne (*Basal*) und mit 10  $\mu$ M 8-pCPT-2Me-cAMP für 1 min stimuliert ( $n = 5$ ) (**A**). In mit Fura-2-beladenen Zellen wurde der  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg durch 10  $\mu$ M 8pCPT-2Me-cAMP bestimmt (**B**). Der Pfeil kennzeichnet den Zeitpunkt der Zugabe von 8-pCPT-2Me-cAMP. Dargestellt ist ein typisches Experiment.

Im Folgenden wurde nun der Effekt von 8-pCPT-2Me-cAMP auf die Aktivierung von ERK1/2 in HEK-293-Zellen geprüft. Die Stimulation der Zellen mit dem Epac-spezifischem cAMP-Analog führte ähnlich wie der  $\beta_2$ -AR-Agonist Adrenalin zu einer schnellen und transienten Aktivierung von ERK1 und ERK2. Eine maximale ERK-Aktivierung durch 8-pCPT-2Me-cAMP wurde nach 5-10 min beobachtet. Dieser stimulatorische Effekt war nach 30 min nicht mehr detektierbar (Abb. 13A). Eine halbmaximale und maximale Aktivierung von ERK1/2 wurde bei  $\sim 1$   $\mu$ M und  $\sim 10$   $\mu$ M 8-pCPT-2Me-cAMP erzielt (Abb. 13B). Somit scheinen Epac-Proteine als neue cAMP-Effektoren eine wesentliche Bedeutung für die cAMP-abhängige Aktivierung von ERK1/2 in HEK-293-Zellen zu spielen.



**Abb. 13: Aktivierung von ERK1/2 durch 8pCPT-2Me-cAMP.**  $\beta_2$ -AR-exprimierende HEK-293-Zellen wurden für die angegebene Zeit ohne (*Basal*) und mit 10  $\mu$ M 8pCPT-2Me-cAMP (**A**) oder für 5 min mit 8-pCPT-2Me-cAMP in den angegebenen Konzentrationen stimuliert (**B**). Die Immunoblots im oberen Teil der Abbildung stellen typische Experimente dar. Für die quantitative Auswertung der Daten ( $n = 3-5$ ) wurde der Gehalt an P-ERK1/2 in unstimulierten Zellen zu 1 gesetzt.

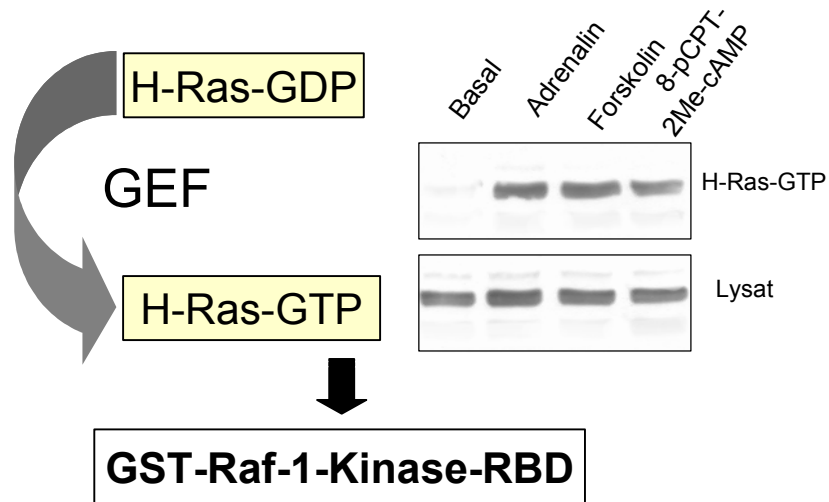
Wie vorher gezeigt (siehe Abb. 11), wurde die Aktivierung von ERK1/2 durch den  $\beta_2$ -AR durch Expression von dominant negativem S17N H-Ras unterdrückt. Expression von S7N H-Ras reduzierte auch die Aktivierung von ERK1/2 durch 8-pCPT-2Me-cAMP (Abb. 14). Somit kann man mutmaßen, dass H-Ras *downstream* von Epac-Proteinen auf dem Signalweg zu ERK1/2 liegt.



**Abb.14: Hemmung der durch 8-pCPT-2Me-cAMP induzierten Aktivierung von ERK1/2 durch S17N H-Ras.** HEK-293-Zellen wurden nur mit den  $\beta_2$ -AR (*Kontrolle*) oder zusammen mit S17N H-Ras (100  $\mu$ g cDNA) transfiziert. Anschließend wurden die Zellen ohne (-) und mit 10  $\mu$ M 8-pCPT-2Me-cAMP für 5 min stimuliert. Die Immunoblots im oberen Teil der Abbildung stellen typische Experimente dar. Für die quantitative Auswertung der Daten ( $n = 3-5$ ) wurde der Gehalt an P-ERK1/2 in unstimulierten Zellen zu 1 gesetzt.

Im Folgenden wurde nun geprüft, ob H-Ras in der Tat aktiviert wird. Die Aktivierung von H-Ras wurde dabei mittels der *Pull-down*-Technik untersucht. Bei dieser Methode nutzt man, dass GTP-beladenes H-Ras eine hohe Affinität zu seinem Effektorprotein Raf-1 aufweist. An Glutathion-Sepharose-Beads gekoppeltes GST-Fusionsprotein der Ras-Bindungsdomäne (RBD) von Raf-1 kann somit zur Bestimmung von H-Ras-GTP in Zelllysaten eingesetzt werden. Der Anteil an GTP-gebundenem H-Ras wird anschließend im Immunoblot mit spezifischen Antikörpern

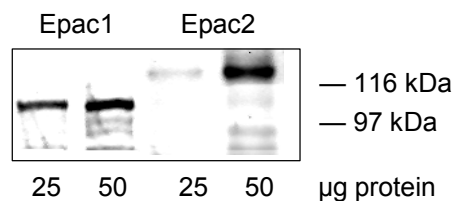
bestimmt (Franke *et al.*, 1997). Wie in der Abb. 15 dargestellt, bewirkten sowohl Adrenalin als auch Forskolin und 8-pCPT-2Me-cAMP eine GTP-Beladung, d.h. Aktivierung von H-Ras. Somit führt eine direkte Aktivierung von Epac-Proteinen in HEK-293-Zellen zu einer GTP-Beladung von H-Ras, was nachfolgend in eine Aktivierung von ERK1/2 mündet.



**Abb.15: Aktivierung von H-Ras durch Adrenalin, Forskolin und 8-pCPT-2Me-cAMP.** HEK-293-Zellen wurden mit dem  $\beta_2$ -AR (25  $\mu$ g cDNA) und Wildtyp-H-Ras (50  $\mu$ g cDNA) kotransfiziert. Die Zellen wurden ohne (*Basal*) und mit 10  $\mu$ M Adrenalin, 30  $\mu$ M Forskolin oder 10  $\mu$ M 8pCPT-2Me-cAMP für 5 min (Adrenalin, 8-pCPT-2Me-cAMP) bzw. 15 min (Forskolin) stimuliert. Anschließend wurde der Anteil an H-Ras-GTP in Lysaten dieser Zellen durch an Glutathion-Sepharose-Beads gekoppeltes GST-Raf-1-RBD bestimmt. Das gebundene H-Ras-GTP und der Gesamtgehalt an H-Ras (*Lysat*) wurden im Immunoblot mittels eines H-Ras-spezifischen Antikörpers detektiert. Dargestellt ist ein typisches Experiment ( $n = 4$ ). Das Prinzip der *Pull-down* Technik ist schematisch dargestellt.

Die Aktivierung von H-Ras und ERK1/2 durch das Epac-spezifische 8-pCPT-2Me-cAMP deuteten darauf hin, dass Epac-Familie endogen in HEK-293-Zellen exprimiert werden. Dieser pharmakologische Ansatz sollte durch Nachweis der Expression der Proteine (Epac1, Epac2) in den HEK-293-Zellen verifiziert werden. Dazu wurden Epac-spezifische Antikörper eingesetzt. Wie in der Abb. 16 dargestellt, exprimieren HEK-293-Zellen endogen sowohl Epac1 (~100 kDa) als auch Epac2

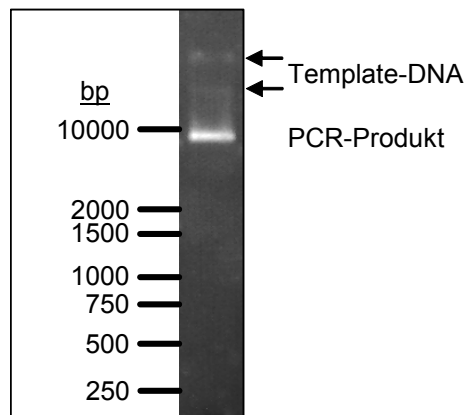
(~116 kDa). Der Nachweis der endogenen Expression von Epac1 und Epac2 wurde in Membranen von HEK-293-Zellen durchgeführt, da diese Proteine vermutlich aufgrund einer N-terminalen DEP-Domäne primär membranassoziiert vorliegen (siehe Abb. 4; de Rooij *et al.*, 1998; Kawasaki *et al.*, 1998; Bos, 2003; Springett *et al.*, 2004).



**Abb. 16: Endogene Expression von Epac1 und Epac2 in HEK-293-Zellen.** Membranen von HEK-293-Zellen (25 µg, 50 µg) wurden über eine 10 %ige SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend erfolgte der Nachweis der Expression von Epac1 und Epac2 im Immunoblot mittels Epac1-spezifischer und Epac2-spezifischer Antikörper. Dargestellt ist ein typisches Experiment ( $n = 3$ ).

Die Epac-Proteine Epac1 und Epac2 sind Rap-spezifische Austauschfaktoren, die durch direkte Bindung von cAMP aktiviert werden (de Rooij *et al.*, 1998; Kawasaki *et al.*, 1998; Bos, 2003; Springett *et al.*, 2004; siehe Abb. 3 und 4). Die Entwicklung des Epac-spezifischen cAMP-Derivates 8-pCPT-2Me-cAMP eröffnete erstmals die Möglichkeit, Epac-Proteine direkt und spezifisch, d.h. ohne gleichzeitige Aktivierung der PKA zu aktivieren (Enserink *et al.*, 2002; siehe oben). Zur Ausschaltung der Funktion endogen exprimierter Proteine benötigt man spezifische Hemmstoffe, die es bisher für Epac-Proteine jedoch nicht gibt. Deshalb wurde ein molekularbiologischer Ansatz gewählt. Durch Austausch hochkonservierter Argininreste in den cAMP-Bindungsdomänen von Epac1 und Epac2 können inaktive, cAMP-Bindungs-defiziente Mutanten generiert werden, die Rap-Proteine nicht mehr aktivieren (siehe Abb. 4; Kawasaki *et al.*, 1998; Ozaki *et al.*, 2000; Rehmann *et al.*, 2003a). Daher wurde in Epac1 durch ortsgerichtete Mutagenese das Arginin in der Position 279 gegen ein Lysin ausgetauscht und somit die cAMP-Bindungs-defiziente Mutante R279K Epac1 generiert. Die Mutation wurde mittels PCR eingefügt. Der PCR-Ansatz enthielt das Template pMT2-HA[Epac1] (GeneBank accession number AF103905) und die Primer epacR279K FOR und epacR279K REV. Zur Kontrolle

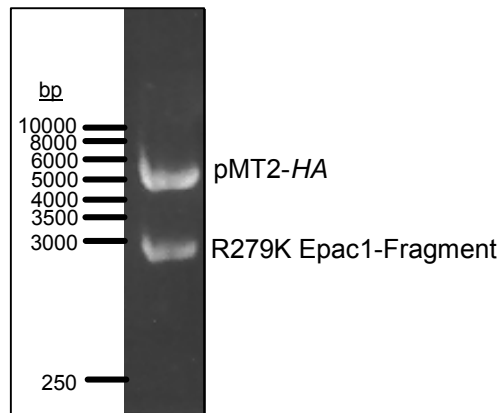
wurden 1,0 µl des PCR-Ansatzes im Gel überprüft. Wie in der Abb. 17 dargestellt, war neben den schwachen Signalen der zirkulären Template-DNA (>10 kb) eine deutliche Bande des linearen PCR-Produktes zu erkennen (7700 bp).



**Abb. 17: Ortsgerichtete Mutagenese von Epac1.** Mittels PCR (Template: pMT2-*HA*[Epac1] (AF103905); Primer: epacR279K FOR, epacR279K REV) wurde in der Wildtyp-Sequenz von Epac1 eine Basensubstitution eingeführt ( $C_{835}G_{836}G_{837}$  zu  $A_{835}A_{836}G_{837}$ ), die zu dem Aminosäureaustausch Arg<sup>279</sup> zu Lys<sup>279</sup> führt. Die zirkuläre Template-DNA (entspannt und supercoiled; >10 kb) sowie das lineare PCR-Produkt (7700 bp) sind markiert. Der Größenstandard ist angegeben.

Der PCR-Ansatz wurde mit der Restriktionsendonuklease *Dpn* I verdaut. Dieses Enzym spaltet ausschließlich methylierte und hemimethylierte DNA. Da die parenterale Plasmid-DNA aus Bakterien stammt und somit methyliert ist, wird nur diese erkannt und hydrolysiert. Durch die *Dpn* I wurde somit nur die parenterale, nicht-mutierte DNA in kurze Fragmente abgebaut, während die mutierten DNA-Stränge erhalten blieben. Diese konnten hybridisieren und wurden während der nachfolgenden Ligationsreaktion zu einem zirkulären DNA-Plasmid ligiert. Das Plasmid wurde mittels Elektroporation in *E. coli*-Zellen eingeschleust, die Bakterien wurden auf einer ampicillinhaltigen LB-Agarplatte vereinzelt und über Nacht bei 37°C bebrütet. Einige Kolonien wurden zur Minipräparation genutzt und die isolierten DNA-Klone für eine Testspaltung eingesetzt. Die Restriktionsenzyme *Sal* I und *Not* I wurden zur Klonierung des Epac1-Konstruktes benutzt und schneiden direkt vor bzw. hinter dem *open reading frame* (ORF) der Epac1-Sequenz. Wie in der Abb. 18 dargestellt, wurde durch Doppelverdau der DNA-Klone mit diesen Enzymen die

positiven Konstrukte in das Vektor-Fragment (5058 bp) und das R279K Epac1-Fragment (2646 bp) gespalten.

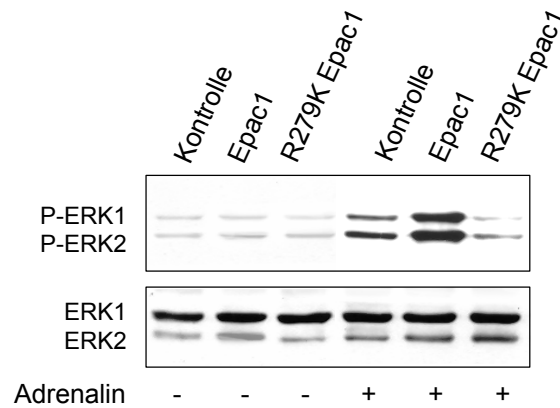


**Abb.18: Identifizierung der Mutante pMT2-HA[R279K Epac1] durch *Sal* I/*Not* I-Spaltung.** Durch Doppelverdau verschiedener DNA-Klone wurden positive Konstrukte in den ORF von R279K Epac1 (2646 bp) und den Vektor pMT2-HA (5058 bp) gespalten. Der Größenstandard ist angegeben.

Durch den Testverdau konnte jedoch nicht die Mutation überprüft werden. Zur Sequenzierung des vollständigen ORF und somit auch zur Kontrolle des mutierten Basentriplets wurde die DNA des Klons 3 gereinigt (QIAquick PCR Purification Kit) und zur Sequenzierung geschickt. Als Sequenzierprimer kamen die Oligonukleotide A280G Seq1, A280G Seq2, epac420 REV, epac1400 FOR und epac2100 FOR zum Einsatz (siehe „Material und Methoden“). Nach Bestätigung der korrekten Sequenz wurde die positive DNA für die folgenden Experimente in großem Maßstab präpariert.

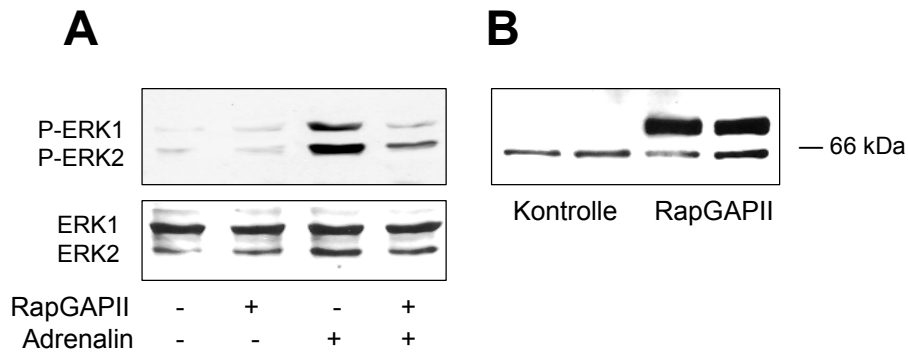
Es wurde nun geprüft, ob und wie durch Expression der Epac1-Mutante im Vergleich zu Wildtyp-Epac1 die Aktivierung von ERK1/2 durch den  $\beta_2$ -AR beeinflusst wird. Wie in der Abb. 19 dargestellt, wurde die durch Adrenalin induzierte Aktivierung von ERK1/2 durch Überexpression von Wildtyp-Epac1 drastisch gesteigert ( $n = 6$ ;  $p < 0.008$ ). Dagegen unterdrückte eine Expression von R279K Epac1 die Aktivierung von ERK1/2 durch Adrenalin nahezu vollständig ( $n = 4$ ;  $p < 0.003$ ).





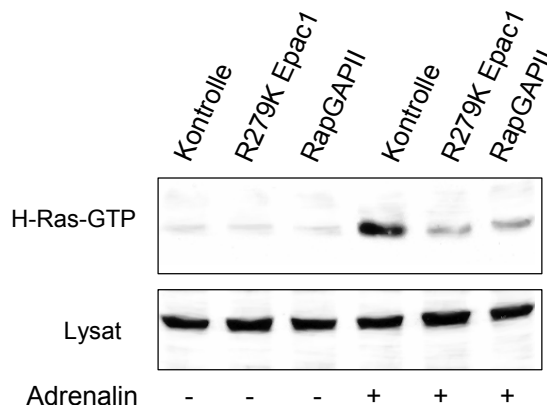
**Abb. 19: Regulation der  $\beta_2$ -AR-vermittelten Aktivierung von ERK1/2 durch R279K Epac1 und Wildtyp-Epac1.** HEK-293-Zellen wurden nur mit dem  $\beta_2$ -AR (*Kontrolle*) oder zusammen mit Wildtyp-Epac1 (25  $\mu$ g cDNA) oder R279K Epac1 (100  $\mu$ g cDNA) transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen ohne (-) und mit 10  $\mu$ M Adrenalin für 5 min stimuliert. Dargestellt ist ein typisches Experiment der ERK-Phosphorylierung ( $n = 4$ ).

Die Epac-Proteine sind spezifische Austauschfaktoren für Rap-GTPasen, die direkt durch Bindung von cAMP aktiviert werden (Bos, 2003; Springett *et al.*, 2004). Da die durch Adrenalin induzierte ERK-Aktivierung durch Expression der cAMP-Bindungs-defizienten Epac1-Mutante unterdrückt und durch direkte Aktivierung von Epac-Proteinen (durch 8-pCPT-2Me-cAMP) imitiert wurde, lag es nahe anzunehmen, dass in die Aktivierung von ERK1/2 durch den  $\beta_2$ -AR nicht nur H-Ras, sondern auch GTPasen der Rap-Familie (offensichtlich jedoch nicht Rap1A, siehe Abb. 11) eingeschaltet sind. Diese Schlussfolgerung wurde durch ein weiteres Experiment bestätigt. Dazu wurde in den Zellen RapGAPII, ein GTPase-aktivierendes Protein, also ein spezifischer Inaktivator von Rap-GTPasen exprimiert (de Bruyn *et al.*, 2002). Wie in der Abb. 20 dargestellt, reduzierte die Expression von RapGAPII die durch Adrenalin induzierte Aktivierung von ERK1/2 drastisch ( $n = 3$ ;  $p < 0.002$ ).



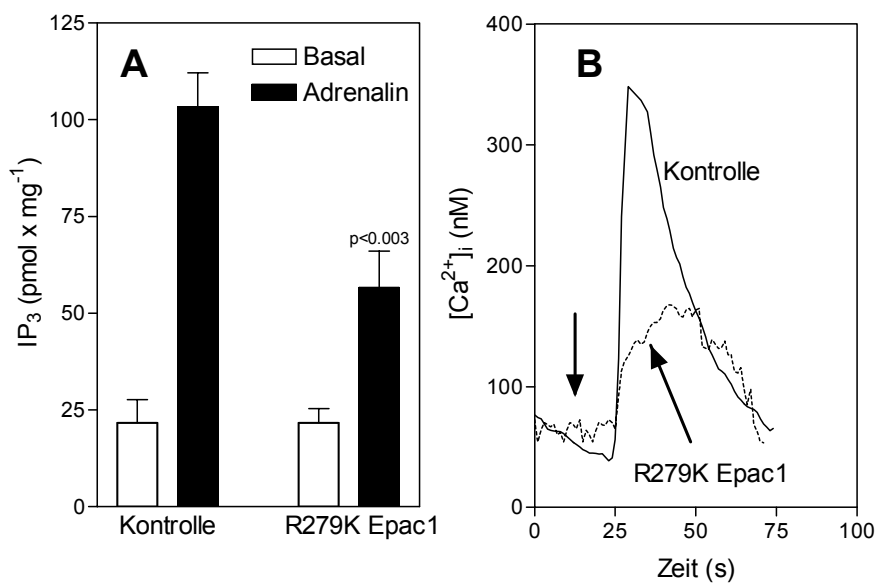
**Abb. 20: Hemmung der  $\beta_2$ -AR-vermittelten Aktivierung von ERK1/2 durch RapGAPII.** HEK-293-Zellen wurden nur mit dem  $\beta_2$ -AR (*Kontrolle*) oder zusammen mit RapGAPII (100  $\mu$ g cDNA) transfiziert. Anschließend wurden die Zellen ohne (-) und mit 10  $\mu$ M Adrenalin für 5 min stimuliert (**A**). Dargestellt ist ein typisches Experiment der ERK-Phosphorylierung ( $n = 3$ ). (**B**) Nachweis der Expression von HA-getagtem RapGAPII.

Durch Expression von R279K Epac1 und RapGAPII wurde nicht nur die ERK-Aktivierung unterdrückt. Expression von R279K Epac1 unterdrückte auch die Aktivierung von H-Ras durch Adrenalin nahezu komplett ( $n = 4$ ;  $p < 0.003$ ); ein ähnlicher Hemmeffekt wurde durch Expression von RapGAPII erzielt ( $n = 5$ ;  $p < 0.002$ ) (Abb. 21). Dieses Ergebnis ließ vermuten, dass die Epac-abhängige Aktivierung von ERK1/2 und H-Ras durch den  $\beta_2$ -AR durch eine Rap-GTPase, nicht jedoch durch Rap1A vermittelt wird.



**Abb. 21: Hemmung der durch Adrenalin induzierten Aktivierung von H-Ras durch R279K Epac1 und RapGAPII.** HEK-293-Zellen wurden nur mit dem  $\beta_2$ -AR (*Kontrolle*) oder zusammen mit R279K Epac1 oder RapGAPII (jeweils 100  $\mu$ g cDNA) transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen ohne (-) und mit 10  $\mu$ M Adrenalin für 5 min stimuliert. Dargestellt ist ein typisches Experiment der H-Ras-Aktivierung ( $n = 5$ ).

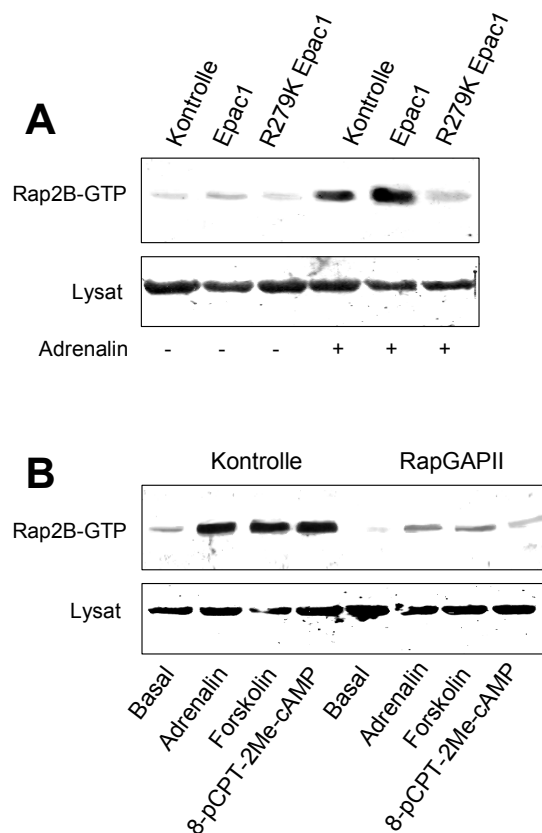
Unsere Arbeitsgruppe hatte kürzlich gezeigt, dass der  $\beta_2$ -AR unter Beteiligung von Epac-Proteinen die GTP-Beladung von Rap2B induziert, welches dann die PLC- $\epsilon$  stimuliert (Schmidt *et al.*, 2001; vom Dorp *et al.*, 2004). Zunächst wurden daher geprüft, ob eine Expression von R279K Epac1 PLC- und  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale beeinflusst. Wie in der Abb. 22A gezeigt, wurde durch Expression der cAMP-Bindungsdefizienten Epac1-Mutante die durch Adrenalin induzierte  $\text{IP}_3$ -Bildung deutlich reduziert. In Übereinstimmung damit wurde auch die durch Adrenalin induzierte  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Erhöhung durch die Expression von R279K Epac1 drastisch gesenkt, von  $295 \pm 35$  nM auf  $131 \pm 15$  nM ( $n = 6$ ) (Abb. 22B).



**Abb. 22: Reduktion der durch Adrenalin induzierten PLC-Stimulation und  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Erhöhung durch R279K Epac1.** HEK-293-Zellen wurden nur mit dem  $\beta_2$ -AR (*Kontrolle*) oder zusammen mit R279K Epac1 (100  $\mu\text{g}$  cDNA) transfiziert. Anschließend wurde die  $\text{IP}_3$ -Bildung ohne (*Basal*) und mit 10  $\mu\text{M}$  Adrenalin für 1 min stimuliert ( $n = 5$ ) (A). In mit Fura-2-beladenen Zellen wurde der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg durch 10  $\mu\text{M}$  Adrenalin bestimmt (B). Der Pfeil kennzeichnet den Zeitpunkt der Zugabe von Adrenalin. Dargestellt ist ein typisches Experiment.

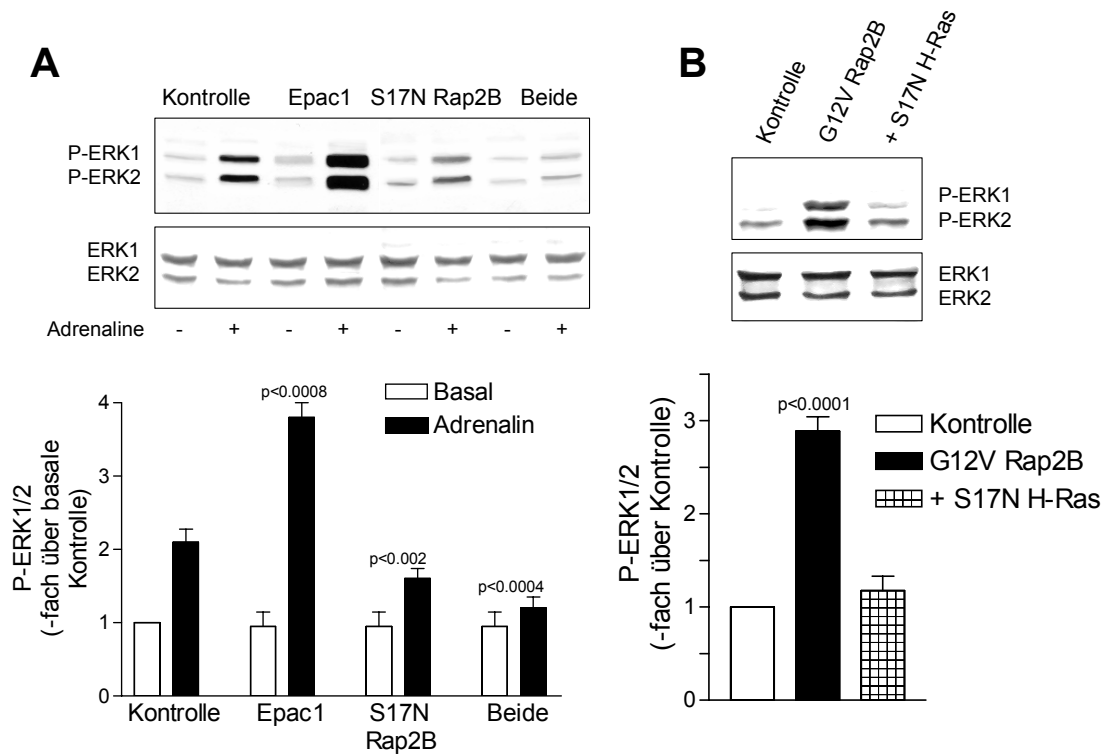
Im Folgenden wurde nun geprüft, ob in die Aktivierung von ERK1/2 und H-Ras durch den  $\beta_2$ -AR die GTPase Rap2B eingeschaltet ist. Zunächst wurde eine Epac-abhängige Aktivierung von Rap2B durch den  $\beta_2$ -AR mittels der *Pull-down*-Technik untersucht. Ähnlich wie bei der Messung der Aktivierung von H-Ras nutzt man zur Bestimmung von zellulärem Rap2B-GTP seine spezifische Interaktion mit an

Glutathion-Sepharose-Beads gekoppelten GST-RafGDS-RBD. Der Anteil an GTP-gebundenen Rap2B in Zelllysaten wird dann im Immunoblot mit einem spezifischen Rap2-Antikörper erfasst. Wie in der Abb. 23 dargestellt, induzierten Adrenalin, Forskolin und 8-pCPT-2Me-cAMP eine Aktivierung, d.h. GTP-Beladung von Rap2B. Während durch Überexpression von Wildtyp-Epac1 die durch Adrenalin induzierte Aktivierung von Rap2B gesteigert wurde, wurde diese Aktivierung durch Expression von R279K Epac1 drastisch reduziert ( $n = 4$ ;  $p < 0.003$ ) (Abb. 23A). Auch durch Expression von RapGAPII wurde die Agonist-induzierte Aktivierung von Rap2B nahezu vollständig unterdrückt (Abb. 23B).



**Abb. 23: Hemmung der Agonist-induzierten Aktivierung von Rap2B durch R279K Epac1 und RapGAPII.** HEK-293-Zellen wurden mit dem  $\beta_2$ -AR und Wildtyp-Rap2B (50  $\mu$ g cDNA, *Kontrolle*) allein oder zusammen mit Wildtyp-Epac1 (25  $\mu$ g cDNA), R279K Epac1 (**A**) oder RapGAPII (jeweils 100  $\mu$ g cDNA) (**B**) transfiziert. Anschließend wurden die Zellen ohne (-, *Basal*) und mit 10  $\mu$ M Adrenalin, 30  $\mu$ M Forskolin oder 10  $\mu$ M 8-pCPT-2Me-cAMP stimuliert. Der Anteil an Rap2B-GTP in Lysaten dieser Zellen wurde durch an Glutathion-Sepharose-Beads gekoppeltes GST-RafGDS-RBD bestimmt. Das gebundene Rap2B-GTP und der Gesamtgehalt an Rap2B (*Lysat*) wurde im Immunoblot mittels eines Rap2-spezifischen Antikörpers detektiert. Dargestellt sind typische Experimente ( $n = 4-5$ ).

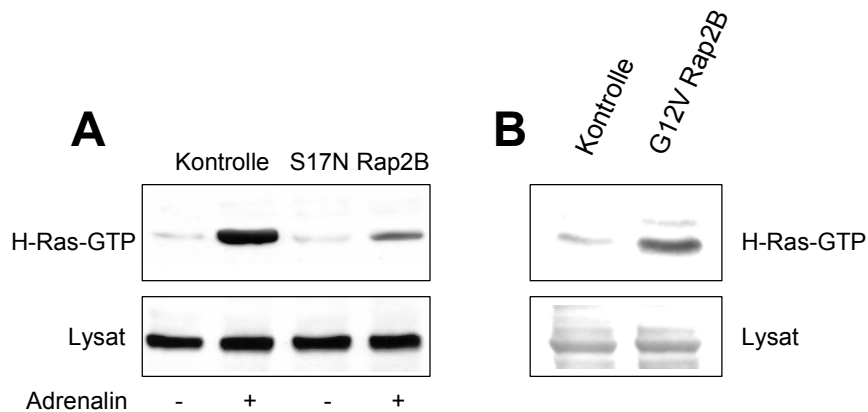
Diese Daten legen nahe, dass Rap2B möglicherweise die Rap-GTPase ist, die in die Aktivierung von H-Ras und ERK1/2 durch den  $\beta_2$ -AR eingeschaltet ist. Um dies zu prüfen, wurde die dominant negative Rap2B-Mutante S17N Rap2B in den Zellen exprimiert und nachfolgend die Effekte auf die Aktivierung von ERK1/2 durch Adrenalin untersucht. Wie in der Abb. 24A dargestellt, wurde durch Expression von S17N Rap2B die durch Adrenalin induzierte Aktivierung von ERK1/2 sowie die Potenzierung dieser Rezeptorantwort, die nach Überexpression von Wildtyp-Epac1 zu sehen war, drastisch reduziert. Somit scheint Rap2B von zentraler Bedeutung für die cAMP/Epac- und H-Ras-abhängige Aktivierung von ERK1/2 durch den  $\beta_2$ -AR zu sein. In Übereinstimmung damit wurde durch Expression von konstitutiv aktivem Rap2B (G12V Rap2B) eine Aktivierung von ERK1/2 beobachtet, und dieser stimulatorische Effekt von G12V Rap2B wurde durch Koexpression von inaktivem H-Ras komplett revertiert (Abb. 24B). Dies zeigte, dass in die cAMP/Epac-abhängige Aktivierung von ERK1/2 durch den  $\beta_2$ -AR neben H-Ras auch offensichtlich Rap2B eingeschaltet ist.



**Abb. 24: Beteiligung von Rap2B an der Aktivierung von ERK1/2 durch den  $\beta_2$ -AR.** HEK-293-Zellen wurden mit dem  $\beta_2$ -AR allein (*Kontrolle*) oder zusammen mit Wildtyp-Epac1 (25  $\mu$ g cDNA), S17N Rap2B (100  $\mu$ g cDNA) oder Epac1 + S17N Rap2B (**A**) oder mit G12V Rap2B (25  $\mu$ g cDNA) sowie G12V Rap2B + S17N H-Ras (100  $\mu$ g cDNA) (**B**) transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen in (**A**) ohne (-) und mit 10  $\mu$ M Adrenalin stimuliert. Die Immunoblots im oberen Teil der Abbildung stellen typische Ergebnisse der ERK-Phosphorylierung dar. Für die quantitative Auswertung der Daten ( $n = 3-5$ ) wurde der Gehalt an P-ERK1/2 in unstimulierten (untransfizierten) Zellen zu 1 gesetzt.

Um zu prüfen, ob und inwieweit H-Ras und Rap2B intrazellulär miteinander verschaltet sind, wurden zwei Strategien eingesetzt. Einerseits wurde geprüft, ob die Aktivierung von H-Ras durch Adrenalin durch dominant negatives Rap2B unterdrückt wird, und zum anderen wurde untersucht, ob konstitutiv aktives G12V Rap2B H-Ras aktiviert. Wie in der Abb. 25A dargestellt, wurde die durch Adrenalin induzierte Aktivierung von H-Ras durch Expression von S17N Rap2B drastisch reduziert ( $n = 4$ ;  $p < 0.004$ ). Andererseits wurde durch die Expression von G12V Rap2B eine GTP-

Beladung von H-Ras induziert. Aus all diesen Daten lässt sich ableiten, dass in die cAMP/Epac-abhängige Aktivierung von ERK1/2 durch den  $\beta_2$ -AR in HEK-293-Zellen die beiden GTPasen Rap2B und H-Ras eingeschaltet sind und dass H-Ras offensichtlich *downstream* von Rap2B liegt.



**Abb. 25: Beteiligung von Rap2B bei der Aktivierung von H-Ras durch den  $\beta_2$ -AR.** HEK-293-Zellen wurden mit dem  $\beta_2$ -AR allein (*Kontrolle*) oder zusammen mit S17N Rap2B (100  $\mu$ g cDNA) (**A**) oder G12V Rap2B (25  $\mu$ g cDNA) (**B**) transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen ohne (-) und mit 10  $\mu$ M Adrenalin für 5 min stimuliert (**A**). Anschließend wurden der Gehalt an H-Ras-GTP und der Gesamtgehalt an H-Ras (*Lysat*) wie in Abb. 15 beschrieben bestimmt. Dargestellt ist ein typisches Experiment ( $n = 3-4$ ).

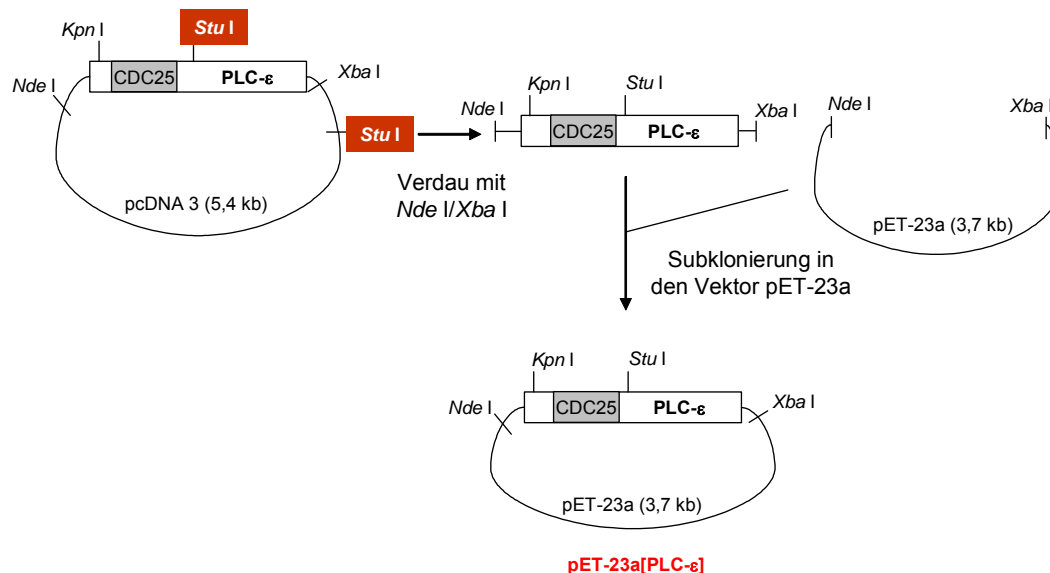
### 4.3 Aktivierung von ERK1/2 und H-Ras durch den $\beta_2$ -AR: Rolle der PLC- $\epsilon$

Unsere Arbeitsgruppe hatte gezeigt, dass aktiviertes Rap2B spezifisch die PLC- $\epsilon$  in HEK-293-Zellen stimuliert. Zudem war gezeigt worden, dass die PLC- $\epsilon$  durch konstitutiv aktives Rap2B an die Plasmamembran transloziert wird und nach Rezeptoraktivierung verstärkt mit Rap2B interagiert (Schmidt *et al.*, 2001; Evellin *et al.*, 2002; vom Dorp *et al.*, 2004; Stope *et al.*, 2004). Es war deshalb nun von Interesse zu untersuchen, ob und inwieweit der Rap2B-Effektor PLC- $\epsilon$  in die Aktivierung von H-Ras und ERK1/2 durch den  $\beta_2$ -AR eingeschaltet ist. Da die PLC- $\epsilon$  als einziger Vertreter der PLC-Familie zwei Enzymaktivitäten, nämlich eine Lipaseaktivität und eine GEF-Aktivität für Ras-ähnliche GTPasen aufweist (Cullen, 2001; Cullen & Lockyer, 2002; Quilliam *et al.*, 2002; siehe Abb. 2), wurde nicht nur geprüft, ob die PLC- $\epsilon$  an der Regulation dieser Zellantworten durch den  $\beta_2$ -AR beteiligt ist, sondern auch, wenn ja, welche der beiden Aktivitäten der PLC- $\epsilon$  dafür verantwortlich ist. Um die Lipaseaktivität auszuschalten, wurde durch Austausch eines hochkonservierten Histidinrestes an der Position 1144 gegen Leucin (H1144L PLC- $\epsilon$ ) eine Lipase-inaktive Mutante der PLC- $\epsilon$  generiert (Lopez *et al.*, 2001). Um die Bedeutung der PLC- $\epsilon$ -spezifischen GEF-Aktivität zu erfassen, die in ihrer N-terminalen CDC25-Domäne lokalisiert ist, wurde eine CDC25-defiziente Mutante der PLC- $\epsilon$  ( $\Delta$ CDC25 PLC- $\epsilon$ ) hergestellt. Bislang gab es nur Deletionsmutanten [Aminosäuren 1-1087; PLC- $\epsilon$   $\Delta$ N], bei denen der komplette N-Terminus inkl. der CDC25-Domäne deletiert war. Diese Deletion unterdrückte zwar komplett die GEF-Aktivität der PLC- $\epsilon$  für Rap1, bei dieser Deletionsmutante waren darüber hinaus aber auch die PH-Domäne sowie Abschnitte der *EF-Hands* entfernt worden (Jin *et al.*, 2001).

Zur Herstellung der  $\Delta$ CDC25 PLC- $\epsilon$ -Mutante sollte das *Kpn* I/*Stu* I-Fragment der cDNA von PLC- $\epsilon$  (No. AF1700711) durch ein entsprechendes PCR-Produkt, welchem die vollständige Sequenz der CDC25-Domäne (Aminosäuren 220-523) fehlt, ersetzt werden. Aufgrund der Tatsache, dass der Vektor pcDNA3 weitere *Stu* I-Restriktionsschnittstellen besitzt, wurde zunächst der vollständige ORF der PLC- $\epsilon$  durch *Nde* I/*Xba* I-Spaltung aus dem Vektor geschnitten und in den Vektor pET-23a



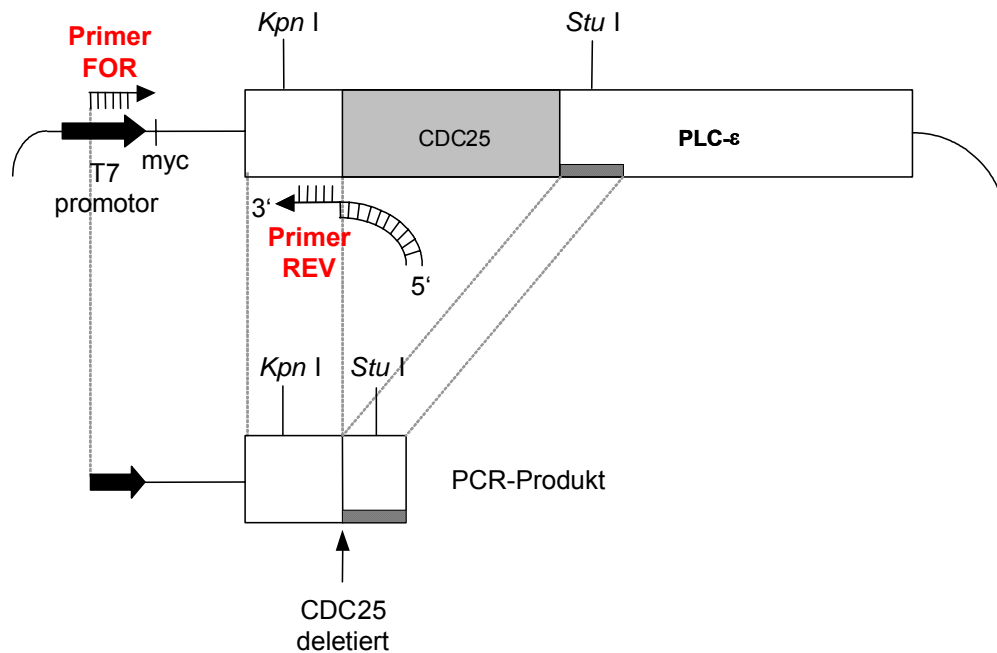
subkloniert. Dieser Vektor besitzt keine *Stu* I-Restriktionsschnittstellen. Somit konnte das Konstrukt pET-23[PLC- $\epsilon$ ] nun mit den Restriktionsenzymen *Kpn* I und *Stu* I verdaut werden und das *Kpn* I/*Stu* I-Fragment aus der PLC- $\epsilon$ -Sequenz deletiert werden (Abb. 26).



**Abb. 26: Subklonierung der PLC- $\epsilon$ -cDNA in pET-23a.** Schematische Darstellung der Subklonierung. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Für die PCR wurden die Primer  $\Delta$ CDC25 PLC $\epsilon$  FOR und  $\Delta$ CDC25 PLC $\epsilon$  REV benutzt. Die Primer wurden so abgeleitet, dass die Schnittstellen *Kpn* I und *Stu* I der PLC- $\epsilon$ -Sequenz im PCR-Produkt vorhanden blieben. Der FOR-Primer hybridisierte mit dem stromaufwärts des PLC- $\epsilon$ -Leserahmen gelegenen T7-Promotor des Konstrukts pcDNA3[PLC- $\epsilon$ ]. Der negativ-orientierte REV-Primer band direkt stromaufwärts der CDC25-Domäne und beinhaltete die Triplets der Aminosäuren 212-219. Das 5'-Ende des Primers bestand aus der Sequenz der Aminosäuren 524-530 und kodierte somit für die Sequenz stromabwärts der CDC25-Domäne inklusive der *Stu* I-Schnittstelle (Abb. 27). Das PCR-Produkt  $\Delta$ CDC25 beinhaltete dadurch die N-terminale DNA-Sequenz der PLC- $\epsilon$  bis zum Kodon der Aminosäure 219, welchem

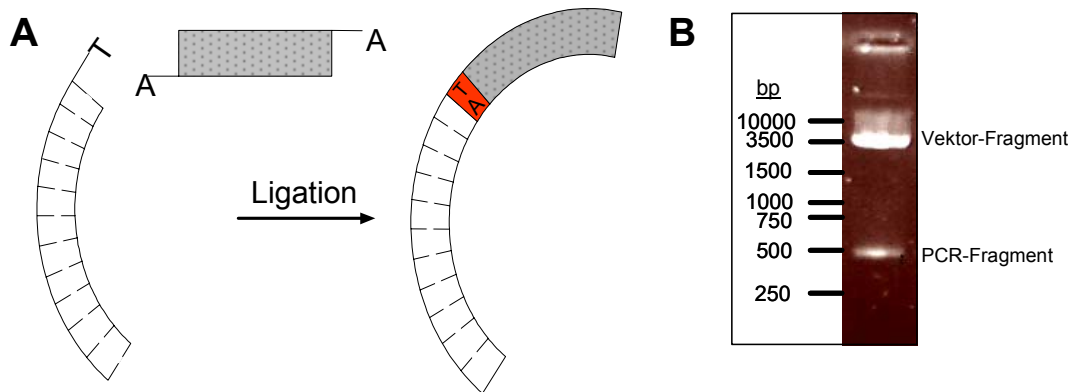
sich direkt die Sequenz der Aminosäuren 524-530 anschließt. Somit wurde die CDC25-Domäne ohne Leserasterverschiebung oder der Insertion von Schnittstellen aus dem PLC- $\epsilon$ -*Kpn* I/*Stu* I-Fragment deletiert.



**Abb. 27: Deletion der CDC25-Sequenz mittels PCR.** Schematische Darstellung der PCR und der damit verbundenen Deletion der CDC25-Sequenz (nt 658 – nt 1569) aus dem ORF der PLC- $\epsilon$ . Weitere Erläuterungen siehe Text.

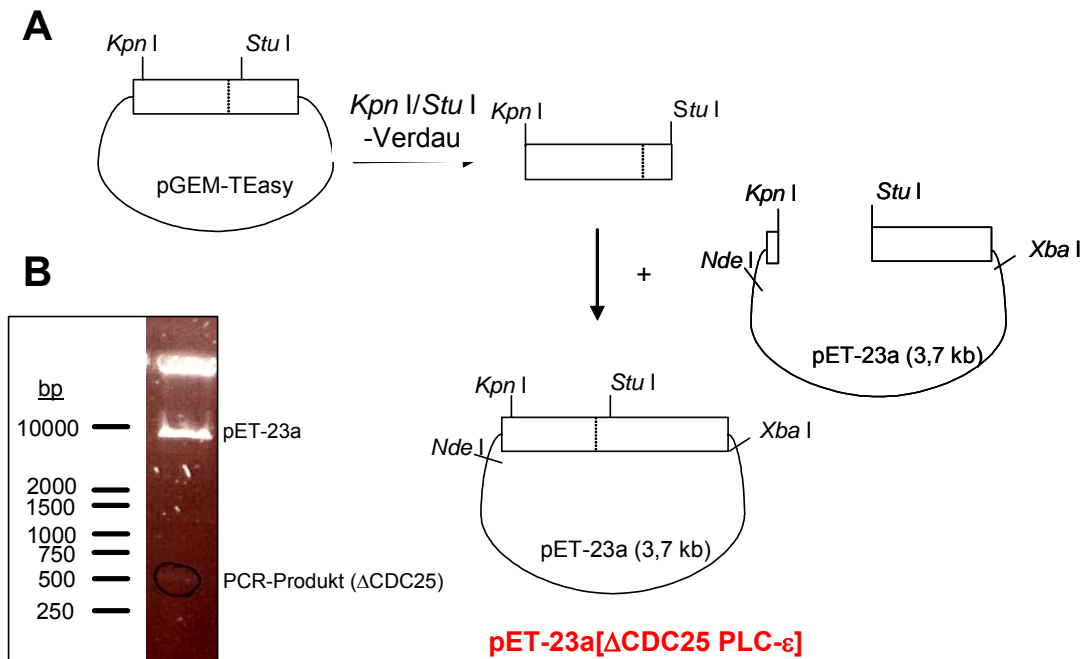
Das PCR-Produkt wurde in den Vektor pGEM-TEasy kloniert. Dieser so genannte T-Vektor besitzt an seinem 3'-Ende einen einzelnen Thymidinüberhang, wodurch Fragmente mit 3'-Adenosinüberhängen ohne Restriktionsverdau in den Vektor ligiert werden können. Zur Herstellung des PCR-Fragmentes wurde das Expand<sup>TM</sup> High Fidelity System benutzt, das neben der *Pwo*-Polymerase auch die *Taq*-Polymerase enthält. Letztere besitzt eine terminale Transferase-Aktivität und fügt unabhängig von der DNA-Matritze Adenosinreste an die 3'-Enden des PCR-Fragmentes, so dass das PCR-Produkt durch TA-Ligation in den Vektor pGEM-

TEasy ligiert werden konnte (Abb. 28). Die Überprüfung des Ligationsproduktes erfolgte durch Doppelspaltung mit den Restriktionsenzymen *Kpn* I/*Stu* I, durch welche das Fragment  $\Delta$ CDC25 aus dem Konstrukt herausgeschnitten wurde.



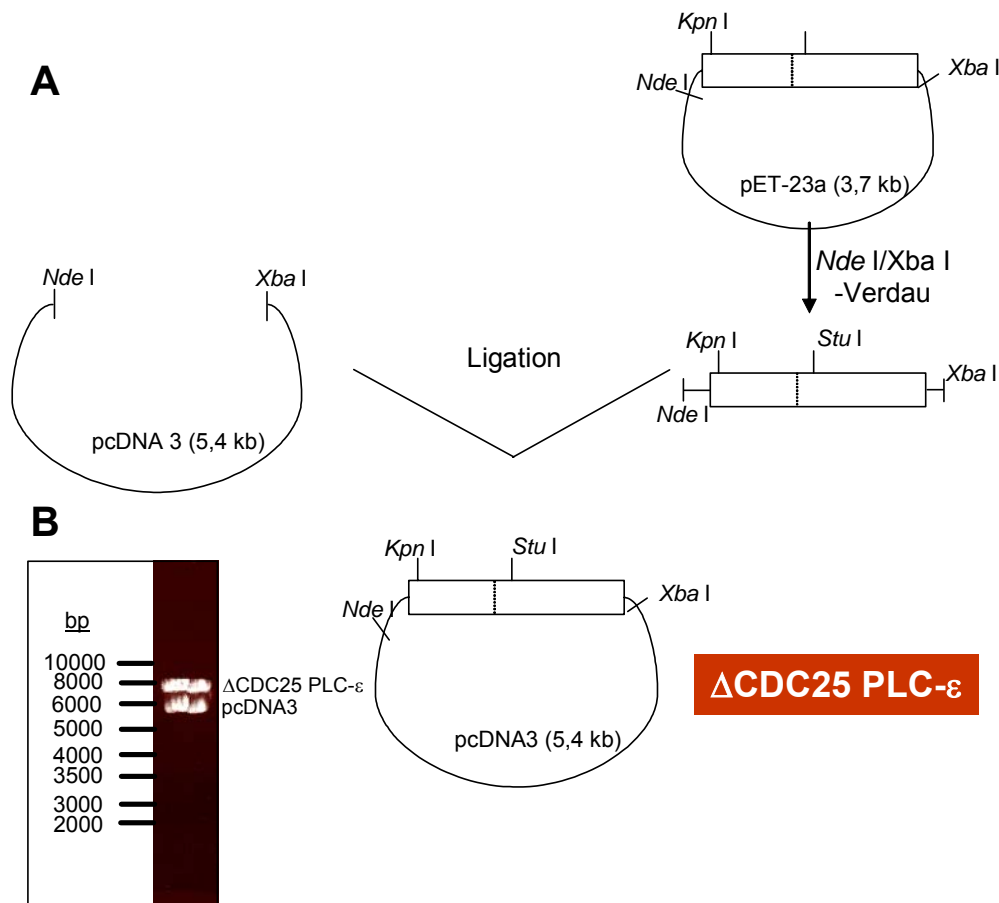
**Abb. 28: Klonierung des PCR-Produkts  $\Delta$ CDC25.** (A) Schematische Darstellung der TA-Ligation (Details siehe Text). (B) *Kpn* I/*Stu* I-Kontrollverdau des Konstruktes pGEM-TEasy[ $\Delta$ CDC25]: Vektorfragment (3368 bp), PCR-Fragment  $\Delta$ CDC25 (452 bp). Der Größenstandard ist angegeben.

Das Konstrukt pGEM-TEasy[ $\Delta$ CDC25] wurde mit den Enzymen *Kpn* I/*Stu* I geschnitten und das  $\Delta$ CDC25-Fragment isoliert. Durch entsprechenden Doppelverdau wurde aus dem Konstrukt pET-23a[PLC- $\epsilon$ ] ebenfalls das *Kpn* I/*Stu* I-Fragment entfernt und mittels Ligation durch das  $\Delta$ CDC25-Fragment ersetzt. Somit lag nun die Sequenz der Mutante  $\Delta$ CDC25 PLC- $\epsilon$  vor (Abb. 29).



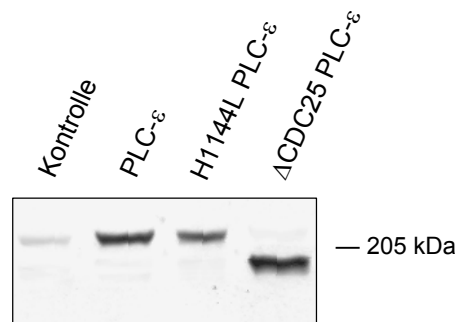
**Abb. 29: Klonierung der  $\Delta$ CDC25 PLC- $\epsilon$ -cDNA in pET-23a.** (A) Schematische Darstellung der Klonierung des Konstruktes pET-23a[ $\Delta$ CDC25 PLC- $\epsilon$ ]. (B) *Kpn*I/*Stu*I-Kontrollverdau von pET-23a[ $\Delta$ CDC25 PLC- $\epsilon$ ]: Vektor-Fragment (9652 bp);  $\Delta$ CDC25-Fragment (452 bp). Der Größenstandard ist angegeben.

Im Folgenden musste die  $\Delta$ CDC25 PLC- $\epsilon$  in den Ursprungsvektor pcDNA3 umkloniert werden. Die vollständige Sequenz der PLC- $\epsilon$ -Deletionsmutante wurde durch Spaltung mit *Nde*I und *Xba*I aus dem Vektor pET-23a geschnitten und mit dem entsprechend verdauten Vektor pcDNA3 ligiert. Die korrekte Sequenz des Konstruktes pcDNA3[ $\Delta$ CDC25 PLC- $\epsilon$ ] wurde durch Testspaltung (Abb. 30) und Sequenzierung (gatc Biotech) überprüft.



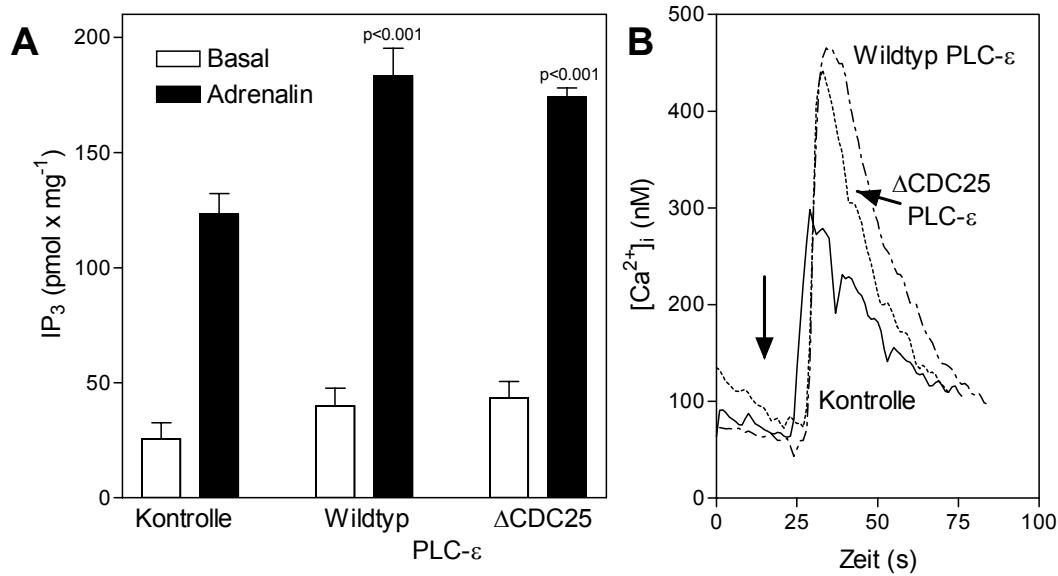
**Abb. 30: Klonierung der  $\Delta$ CDC25 PLC- $\epsilon$ -cDNA in pcDNA3.** (A) Schematische Darstellung der Klonierung des Konstruktes pcDNA3[ $\Delta$ CDC25 PLC- $\epsilon$ ]. (B) Nde I/Xba I-Kontrollverdau von pcDNA3[ $\Delta$ CDC25 PLC- $\epsilon$ ]: Vektor-Fragment (5359 bp);  $\Delta$ CDC25 PLC- $\epsilon$ -Fragment (6475 bp). Der Größenstandard ist angegeben.

Nach Präparation des Plasmids pcDNA3[ $\Delta$ CDC25 PLC- $\epsilon$ ] wurde die Mutante für die funktionellen Experimente eingesetzt. In einem ersten Schritt wurde zunächst die Expression der  $\Delta$ CDC25 PLC- $\epsilon$ -Mutante überprüft. Durch Deletion der 304 Aminosäuren umfassenden CDC25-Domäne wurde ein MG von ~176 kDa (Wildtyp PLC- $\epsilon$  ~210 kDa) erwartet. Für diese Berechnung wurde zugrunde gelegt, dass eine Nukleotidsequenz von 1000 bp für ein Polypeptid von 37 kDa kodiert, wobei jedoch keine posttranslationalen Modifizierungen berücksichtigt werden. Wie in der Abb. 31 dargestellt, wurde die Expression der *myc*-getaggten PLC- $\epsilon$ -Mutanten mit dem erwarteten MG nachgewiesen. Die Expression der PLC- $\epsilon$  wurde auch durch Einsatz eines spezifischen PLC- $\epsilon$ -Antikörpers nachgewiesen (Evellin *et al.*, 2002; Stope *et al.*, 2004; nicht gezeigt).



**Abb. 31: Expression der  $\Delta$ CDC25 PLC- $\epsilon$  in HEK-293-Zellen.** HEK-293-Zellen wurden mit pcDNA3 (*Kontrolle*), Wildtyp PLC- $\epsilon$ , H1144L PLC- $\epsilon$  oder  $\Delta$ CDC25 PLC- $\epsilon$  (jeweils 100  $\mu$ g cDNA) transfiziert. Der Nachweis der Expression der *myc*-getaggtten PLC- $\epsilon$ -Mutanten erfolgte nach Immunpräzipitation mit einem *myc*-spezifischen Antikörper. Dargestellt ist ein typisches Experiment.

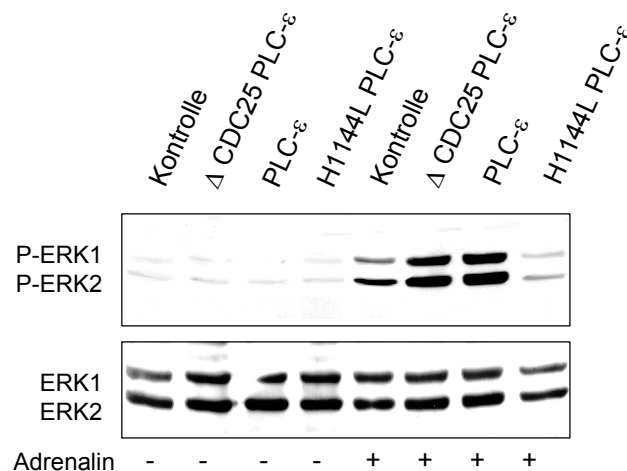
Als nächstes wurde überprüft, ob die  $\Delta$ CDC25 PLC- $\epsilon$  eine im Vergleich zur Wildtyp-PLC- $\epsilon$  unveränderte Lipaseaktivität aufweist. Im Einklang mit früheren Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe wurde durch Überexpression der Wildtyp-PLC- $\epsilon$  die durch Adrenalin stimulierte IP<sub>3</sub>-Bildung deutlich gesteigert; auch der durch Adrenalin induzierte [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-Anstieg wurde durch Überexpression der Wildtyp-PLC- $\epsilon$  deutlich gesteigert, von  $265 \pm 35$  nM auf  $475 \pm 45$  nM ( $n = 8$ ;  $p < 0.001$ ) (Abb. 32). Eine Expression der  $\Delta$ CDC25 PLC- $\epsilon$  führte zu ähnlichen stimulatorischen Effekten auf die PLC- und Ca<sup>2+</sup>-Signale wie die Überexpression von Wildtyp-PLC- $\epsilon$  (Abb. 32). Somit wird die  $\Delta$ CDC25 PLC- $\epsilon$  in den Zellen funktionell exprimiert, offensichtlich ohne Änderung ihrer Lipaseaktivität.



**Abb. 32: Steigerung der durch Adrenalin induzierten PLC-Stimulation und [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-Erhöhung durch ΔCDC25 PLC-ε.** β<sub>2</sub>-AR-exprimierende HEK-293-Zellen wurde mit Wildtyp-PLC-ε oder ΔCDC25 PLC-ε (jeweils 25 μg cDNA) kotransfiziert. Nach 48 h wurde die IP<sub>3</sub>-Bildung ohne (*Basal*) und mit 10 μM Adrenalin für 1 min stimuliert (*n* = 4-5) (**A**). In mit Fura-2 beladenen Zellen wurde der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-Anstieg nach Zugabe von 10 μM Adrenalin bestimmt (**B**). Der Pfeil kennzeichnet den Zeitpunkt der Zugabe von Adrenalin. Dargestellt ist ein typisches Experiment.

Im Folgenden wurde nun untersucht, ob und inwiefern durch Überexpression der Wildtyp-PLC-ε und durch Expression der Lipase-inaktiven PLC-ε (H1144L PLC-ε) und der CDC25-defizienten PLC-ε (ΔCDC25 PLC-ε) die Aktivierung von ERK1/2 durch den β<sub>2</sub>-AR beeinflusst wird. Wie in der Abb. 33 dargestellt, wurde durch eine Überexpression der Wildtyp-PLC-ε und eine Expression der ΔCDC25 PLC-ε die durch Adrenalin induzierte Aktivierung von ERK1/2 zu einem identischen Ausmaß gesteigert (*n* = 6; *p* < 0.003). Eine Überexpression von Wildtyp-PLC-β1 und PLC-δ1 hatte keinen Einfluss auf die ERK-Aktivierung durch den β<sub>2</sub>-AR (nicht gezeigt). Unter identischen Versuchsbedingungen steigerte die PLC-δ1 die basale PLC-Aktivität und durch Überexpression der PLC-β1 wurde die PLC-Stimulation durch den M<sub>3</sub>

Muskarinrezeptor gesteigert (Schmidt *et al.*, 2001; Evellin *et al.*, 2002). Im Unterschied zur  $\Delta$ CDC25 PLC- $\epsilon$  wurde durch Expression der H1144L PLC- $\epsilon$  die Aktivierung von ERK1/2 durch Adrenalin und Forskolin (nicht gezeigt) dagegen unterdrückt ( $n = 4$ ;  $p < 0.001$ ) (Fig. 33). Aus diesen Daten kann abgeleitet werden, dass für die ERK-Aktivierung durch den  $\beta_2$ -AR die Lipaseaktivität, jedoch offensichtlich nicht die Ras-GEF-Aktivität der PLC- $\epsilon$  erforderlich ist.

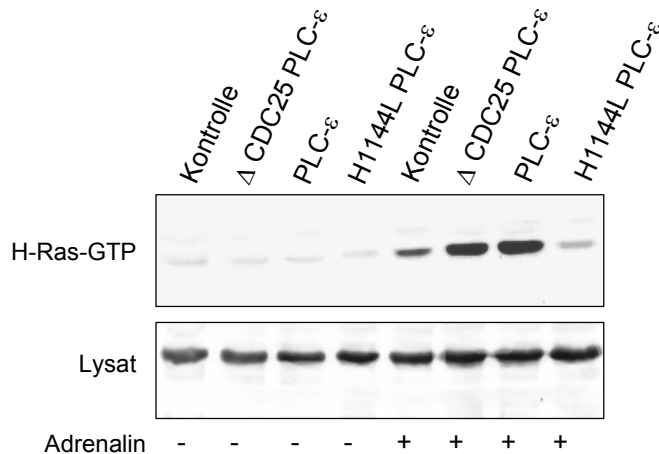


**Abb. 33: Die Aktivierung von ERK1/2 durch den  $\beta_2$ -AR ist abhängig von der Lipaseaktivität der PLC- $\epsilon$ .**  $\beta_2$ -AR-exprimierende HEK-293-Zellen wurde ohne (*Kontrolle*) und mit Wildtyp-PLC- $\epsilon$ ,  $\Delta$ CDC25 PLC- $\epsilon$  (jeweils 25  $\mu$ g cDNA) oder H1144L PLC- $\epsilon$  (100  $\mu$ g cDNA) kotransfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen für 5 min ohne (-) und mit 10  $\mu$ M Adrenalin stimuliert. Anschließend wurde der Gehalt an P-ERK1/2 und ERK1/2 bestimmt. Der gezeigte Immunoblot stellt ein typisches Experiment dar ( $n = 3-6$ ).

Ein nahezu identisches Bild ergab sich bei der Untersuchung der Aktivierung von H-Ras durch den  $\beta_2$ -AR. Überraschenderweise wurde die Aktivierung von H-Ras durch Adrenalin nicht nur durch Überexpression von Wildtyp-PLC- $\epsilon$  ( $n = 6$ ;  $p < 0.007$ ), sondern auch durch Expression von  $\Delta$ CDC25 PLC- $\epsilon$  nahezu verdoppelt ( $n = 4$ ;  $p < 0.006$ ; Abb. 34). Dagegen wurde durch Expression der H1144L PLC- $\epsilon$  die

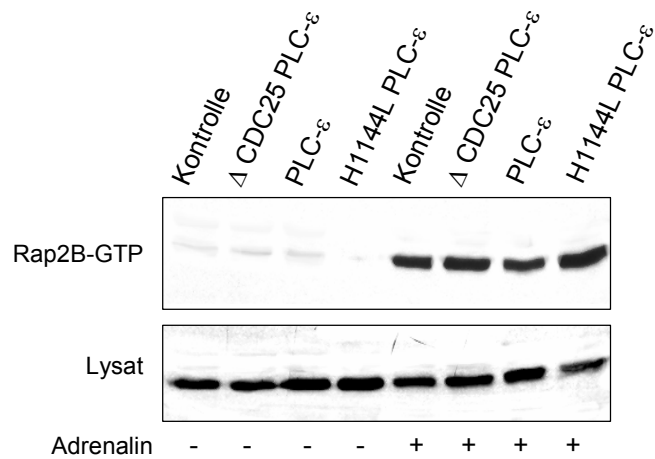


Aktivierung von H-Ras durch Adrenalin nahezu komplett unterdrückt ( $n = 5$ ;  $p < 0.001$ ; Abb. 34). Somit ist die Lipaseaktivität der PLC- $\epsilon$  von zentraler Bedeutung für die Aktivierung von H-Ras durch den  $\beta_2$ -AR. Zudem zeigt dieses Ergebnis, dass die CDC25-Domäne der PLC- $\epsilon$  nicht das GEF ist, welches H-Ras aktiviert und darüber zur Aktivierung von ERK1/2 führt.



**Abb. 34: Die Aktivierung von H-Ras durch den  $\beta_2$ -AR ist abhängig von der Lipaseaktivität der PLC- $\epsilon$ .**  $\beta_2$ -AR-exprimierende HEK-293-Zellen wurde ohne (*Kontrolle*) und mit Wildtyp-PLC- $\epsilon$ ,  $\Delta$ CDC25 PLC- $\epsilon$  (jeweils 25  $\mu$ g cDNA) oder H1144L PLC- $\epsilon$  (100  $\mu$ g cDNA) kotransfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen für 5 min ohne (-) und mit 10  $\mu$ M Adrenalin stimuliert. Anschließend wurden der Gehalt an H-Ras-GTP und der Gesamtgehalt an H-Ras (*Lysat*) bestimmt. Der gezeigte Immunoblot stellt ein typisches Experiment dar ( $n = 3-6$ ).

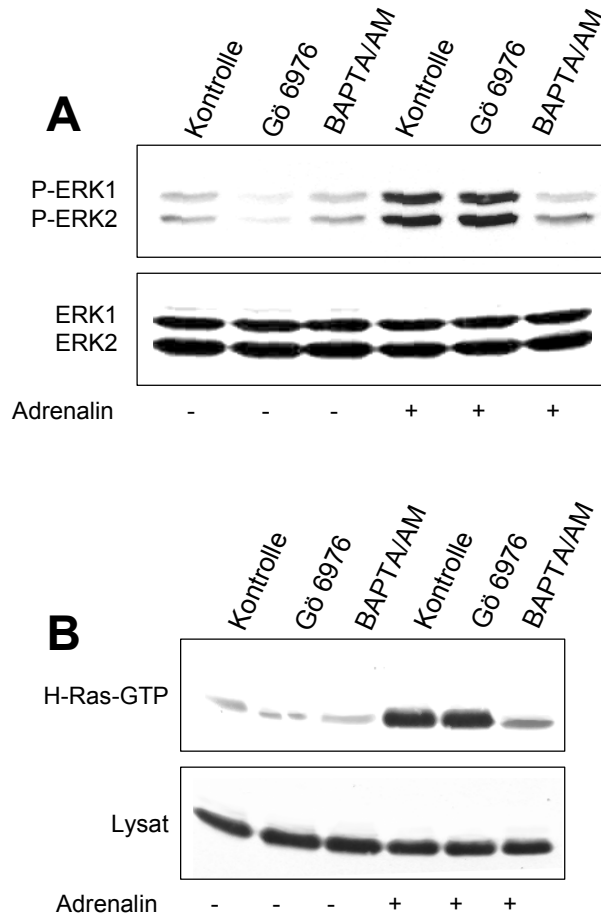
Unsere Arbeitsgruppe hatte gezeigt, dass Rap2B die PLC- $\epsilon$  aktiviert und somit die PLC- $\epsilon$  als Rap2B-Effektor fungiert (Schmidt *et al.*, 2001; Evellin *et al.*, 2002; vom Dorp *et al.*, 2004; Stope *et al.*, 2004). Diese Schlussfolgerung wurde durch ein weiteres Experiment bestätigt. Wie in der Abb. 35 dargestellt, wurde die Aktivierung von Rap2B durch Adrenalin weder durch Überexpression der Wildtyp-PLC- $\epsilon$  noch durch Expression einer der beiden PLC- $\epsilon$ -Mutanten verändert. Somit liegt die GTPase Rap2B *upstream* der PLC- $\epsilon$ , die wiederum offensichtlich für die Aktivierung von H-Ras benötigt wird.



**Abb. 35: Die Aktivierung von Rap2B durch den  $\beta_2$ -AR ist unabhängig von der PLC- $\epsilon$ .**  $\beta_2$ -AR-exprimierende HEK-293-Zellen wurden ohne (*Kontrolle*) und mit Wildtyp-PLC- $\epsilon$ ,  $\Delta$ CDC25 PLC- $\epsilon$  (jeweils 25  $\mu$ g cDNA) oder H1144L PLC- $\epsilon$  (100  $\mu$ g cDNA) kotransfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen für 5 min ohne (-) und mit 10  $\mu$ M Adrenalin stimuliert. Anschließend wurden der Gehalt an Rap2B-GTP und der Gesamtgehalt an Rap2B (*Lysat*) bestimmt. Der gezeigte Immunoblot stellt ein typisches Experiment dar ( $n = 3-6$ ).

#### 4.4 Aktivierung von ERK1/2 und H-Ras durch den $\beta_2$ -AR: Rolle von $\text{Ca}^{2+}$

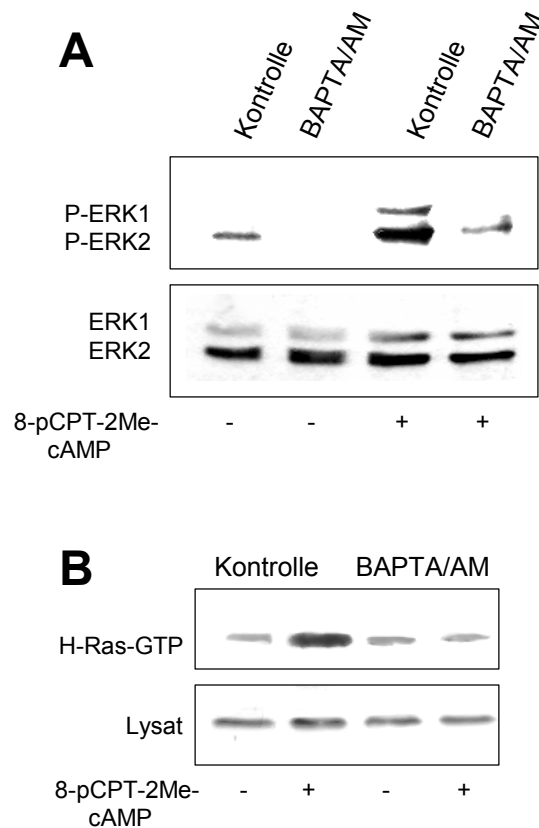
Durch Expression der PLC- $\epsilon$ -Mutanten wurde gezeigt, dass die PLC- $\epsilon$  offensichtlich nicht aufgrund ihrer Ras-GEF-Aktivität, sondern ihrer Lipaseaktivität die Aktivierung von H-Ras und ERK1/2 durch den  $\beta_2$ -AR kontrolliert. Dies ließ vermuten, dass die durch die PLC- $\epsilon$  gebildeten *second messenger*  $\text{IP}_3$  und DAG von zentraler Bedeutung für diese Zellantworten sind. Unsere Arbeitsgruppe hatte früher gezeigt, dass eine Stimulation der PLC- $\epsilon$  durch den  $\beta_2$ -AR zu einer Steigerung von  $\text{IP}_3$ -abhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen und zu einer Membrantranslokation (somit Aktivierung) DAG-sensitiver PKC-Isoformen führt (Schmidt *et al.*, 2001; nicht gezeigt). Um zu prüfen, welcher der beiden *second messenger* die Aktivierung von H-Ras und ERK1/2 durch den  $\beta_2$ -AR reguliert, wurden die Zellen mit Gö 6976, einem Hemmstoff DAG-sensitiver PKC-Isoformen, und mit BAPTA/AM, einem intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelator, vorbehandelt. Wie in der Abb. 36 dargestellt, hatte eine Vorbehandlung der Zellen mit Gö 6976 (100 nM) weder einen Einfluss auf die Aktivierung von ERK1/2 (Abb. 36A) noch auf die Aktivierung von H-Ras durch Adrenalin (Abb. 36B). Im Gegensatz dazu wurden durch Vorbehandlung der Zellen mit BAPTA/AM (20  $\mu\text{M}$ ) sowohl die Aktivierung von ERK1/2 ( $n = 4$ ;  $p < 0.002$ ) als auch die Aktivierung von H-Ras durch Adrenalin ( $n = 5$ ;  $p < 0.001$ ) nahezu komplett unterdrückt (Abb. 36). Somit scheint die PLC- $\epsilon$  durch vermehrte Bildung von  $\text{IP}_3$  und nachfolgende  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung die Aktivierung von H-Ras und ERK1/2 durch den  $\beta_2$ -AR zu ermöglichen.



**Abb. 36: Die Aktivierung von ERK1/2 und H-Ras durch den  $\beta_2$ -AR ist  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig.**  $\beta_2$ -AR-exprimierende HEK-293-Zellen wurde mit Wildtyp H-Ras (50  $\mu\text{g}$  cDNA) (**B**) kotransfiziert. Anschließend wurden die Zellen mit 0,2 % (v/v) DMSO (*Kontrolle*), 100 nM Gö 6976 oder 20  $\mu\text{M}$  BAPTA/AM für 15 min vorbehandelt und dann ohne (-) und mit 10  $\mu\text{M}$  Adrenalin für 5 min stimuliert. Nachfolgend wurden der Gehalt an P-ERK1/2, der Gesamtgehalt an ERK1/2 (**A**), der Gehalt an H-Ras-GTP und der Gesamtgehalt an H-Ras (*Lysat*) (**B**) bestimmt. Die gezeigten Immunoblots stellen typische Experimente dar ( $n = 4-5$ ).

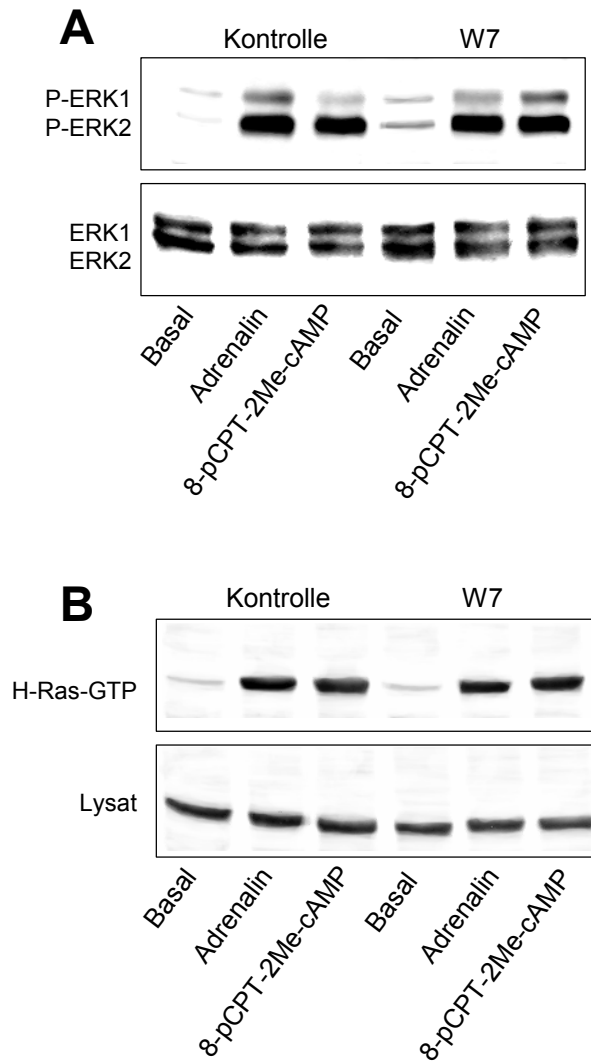
Ähnliche Effekte von BAPTA/AM wurden nach Stimulation der Zellen mit dem Epac-spezifischen cAMP-Analog 8pCPT-2Me-cAMP beobachtet. Sowohl die Aktivierung von ERK1/2 ( $n = 4$ ;  $p < 0.004$ ; Abb. 37A). als auch die Aktivierung von H-Ras durch das Epac-spezifische cAMP-Analog ( $n = 5$ ;  $p < 0.003$ ; Abb. 37B) wurden durch eine Vorbehandlung der Zellen mit BAPTA/AM (20  $\mu\text{M}$ ) drastisch reduziert.

Somit ist die Epac-abhängige Aktivierung von H-Ras und ERK1/2 durch den  $\beta_2$ -AR  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig. Die Ergebnisse ließen zudem vermuten, dass in die PLC- $\epsilon$ -abhängige Aktivierung von H-Ras, und in der Folge von ERK1/2, ein  $\text{Ca}^{2+}$ -reguliertes RasGEF eingeschaltet ist.



**Abb. 37: Die Aktivierung von ERK1/2 und H-Ras durch 8-pCPT-2Me-cAMP ist  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig.**  $\beta_2$ -AR-exprimierende HEK-293-Zellen wurde mit Wildtyp H-Ras (50  $\mu\text{g}$  cDNA) (**B**) kotransfiziert. Anschließend wurden die Zellen mit 0,2 % (v/v) DMSO (*Kontrolle*) oder 20  $\mu\text{M}$  BAPTA/AM für 15 min vorbehandelt und dann für 5 min ohne (-) und mit 10  $\mu\text{M}$  8-pCPT-2Me-cAMP stimuliert. Nachfolgend wurden der Gehalt an P-ERK1/2, der Gesamtgehalt an ERK1/2 (**A**), der Gehalt an H-Ras-GTP und der Gesamtgehalt an H-Ras (*Lysat*) (**B**) bestimmt. Die gezeigten Immunoblots stellen typische Experimente dar (n = 4-5).

$\text{Ca}^{2+}$ -Signale werden in zellulären Systemen mannigfaltig weitergeleitet. Entweder beeinflusst  $\text{Ca}^{2+}$  direkt die Aktivität von Proteinen, wie Proteinkinasen, Phospholipasen, NO-Synthasen und Ionenkanäle, oder die Effekte werden über  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Proteine wie Calmodulin vermittelt (Berridge, *et al.*, 2000; Berridge *et al.*, 2003). Die Austauschfaktor-Aktivität von zwei Gruppen der Ras-Familie-spezifischen Austauschfaktoren wird durch  $\text{Ca}^{2+}$  bzw.  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin reguliert (Bos *et al.*, 2001; Cullen & Lockyer, 2002; Quilliam *et al.*, 2002; Springett *et al.*, 2004). Die GRFs (RasGRFs) enthalten eine N-terminal lokalisierte *Ilimaquinone* (IQ)-Domäne, worüber die GEF-Aktivität dieser Proteine durch  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin stimuliert wird. Dagegen vermitteln eine C-terminal lokalisierte *EF-Hand* und eine C1-Domäne die  $\text{Ca}^{2+}$ /DAG-Sensitivität der GRPs (RasGRPs) (Cullen & Lockyer, 2002; Quilliam *et al.*, 2002; siehe Abb. 3). Daher war es nun von Interesse zu prüfen, ob in die Epac- und  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Aktivierung von H-Ras und ERK1/2 die Austauschfaktoren RasGRF und/oder RasGRP eingeschaltet sind. Um eine mögliche Beteiligung von Mitgliedern der RasGRF-Familie zu erfassen, wurden die Calmodulin-Antagonisten W7, Calmidazolium und Fluphenazin eingesetzt (Gietzen, 1983; Itoh & Hidaka, 1984; Alvarez *et al.*, 1991). Wie in der Abb. 38 dargestellt, hatte eine Vorbehandlung der Zellen mit W7 (100  $\mu\text{M}$ ) keinen Einfluss auf die Aktivierung von ERK1/2 oder H-Ras durch Adrenalin und 8-pCPT-2Me-cAMP. Ähnliche negative Ergebnisse wurden bei einer Vorbehandlung der Zellen mit Calmidazolium und Fluphenazin (jeweils 10  $\mu\text{M}$ ; 15 min) erzielt (nicht gezeigt). Somit scheinen RasGRFs nicht in die Epac- und  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Aktivierung von H-Ras durch den  $\beta_2$ -AR eingeschaltet zu sein.



**Abb. 38: Die Aktivierung von ERK1/2 und H-Ras ist Calmodulin-unabhängig.**  $\beta_2$ -AR-exprimierende HEK-293-Zellen wurde mit Wildtyp-H-Ras (50  $\mu$ g cDNA) (**B**) kotransfiziert. Anschließend wurden die Zellen mit 0,2 % (v/v) DMSO (*Kontrolle*) oder 100  $\mu$ M W7 für 15 min vorbehandelt und dann für 5 min ohne (*Basal*) und mit 10  $\mu$ M Adrenalin oder 10  $\mu$ M 8-pCPT-2Me-cAMP stimuliert. Nachfolgend wurden der Gehalt an P-ERK1/2, der Gesamtgehalt an ERK1/2 (**A**), der Gehalt an H-Ras-GTP und der Gesamtgehalt an H-Ras (*Lysat*) (**B**) bestimmt. Die gezeigten Immunoblots stellen typische Experimente dar (n = 3-5).

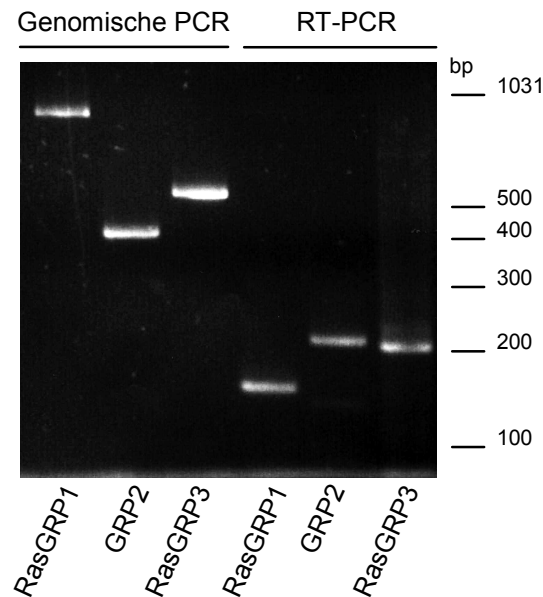
Nachfolgend wurde dann geprüft, ob Mitglieder der RasGRP-Familie die hier beobachtete  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Aktivierung von H-Ras und ERK1/2 regulieren. Die Mitglieder der RasGRP-Familie weisen eine differentielle Substratspezifität aus: Während RasGRP1 und RasGRP4 offensichtlich nur Ras-Proteine aktivieren,

aktiviert RasGRP2 Rap-Proteine und RasGRP3 sowohl Ras- als auch Rap-Proteine (Bos *et al.*, 2001; Cullen & Lockyer, 2002; Quilliam *et al.*, 2002; Springett *et al.*, 2004). Da eine Expression von RasGRP4 bislang nur in Mastzellen nachgewiesen wurde (Yang *et al.*, 2002), konzentrierten wir uns auf RasGRP1, RasGRP2 und RasGRP3. Da keine spezifischen Antikörper gegen Mitglieder der RasGRP-Familie vorliegen und zudem keine RasGRP-spezifischen Hemmstoffe existieren, wurden die folgenden zwei Strategien eingesetzt.

Zunächst wurde geprüft, ob RasGRP1, RasGRP2 und RasGRP3 endogen in HEK-293-Zellen exprimiert werden. Dies erfolgte durch den Nachweis der mRNA mittels reverser Transkription und anschließender PCR. Aus Zelllysaten wurde die Gesamt-mRNA isoliert und mit Oligo-dT<sub>15</sub>-Primer mittels RT-Reaktion in cDNA umgeschrieben. Für die folgende PCR wurden die Primerpaare GRP1 FOR/GRP1 REV (RasGRP1), GRP2 FOR/GRP2 REV (RasGRP2) bzw. GRP3 FOR/GRP3 REV (RasGRP3) eingesetzt. Die Oligonukleotide waren so ausgewählt, dass sie bezogen auf die genomische Sequenz stromabwärts und stromaufwärts vor einem Intron hybridisierten. Somit waren die PCR-Produkte mit cDNA von gespleisster mRNA kürzer als PCR-Fragmente von ungespleisster genomischer DNA, wodurch DNA-Kontaminationen in den RT-PCR-Ansätzen ausgeschlossen werden konnten. PCR-Ansätze mit genomischer DNA als Template dienten als Kontrollen für die Spezifität der Primer. Die gelelektrophoretische Analyse der RT-PCR-Produkte zeigte die erwarteten Fragmente für RasGRP1 (153 bp), RasGRP2 (212 bp) und RasGRP3 (206 bp) (Abb. 39). Somit werden RasGRP1, RasGRP2 und RasGRP3 in HEK-293-Zellen endogen exprimiert.

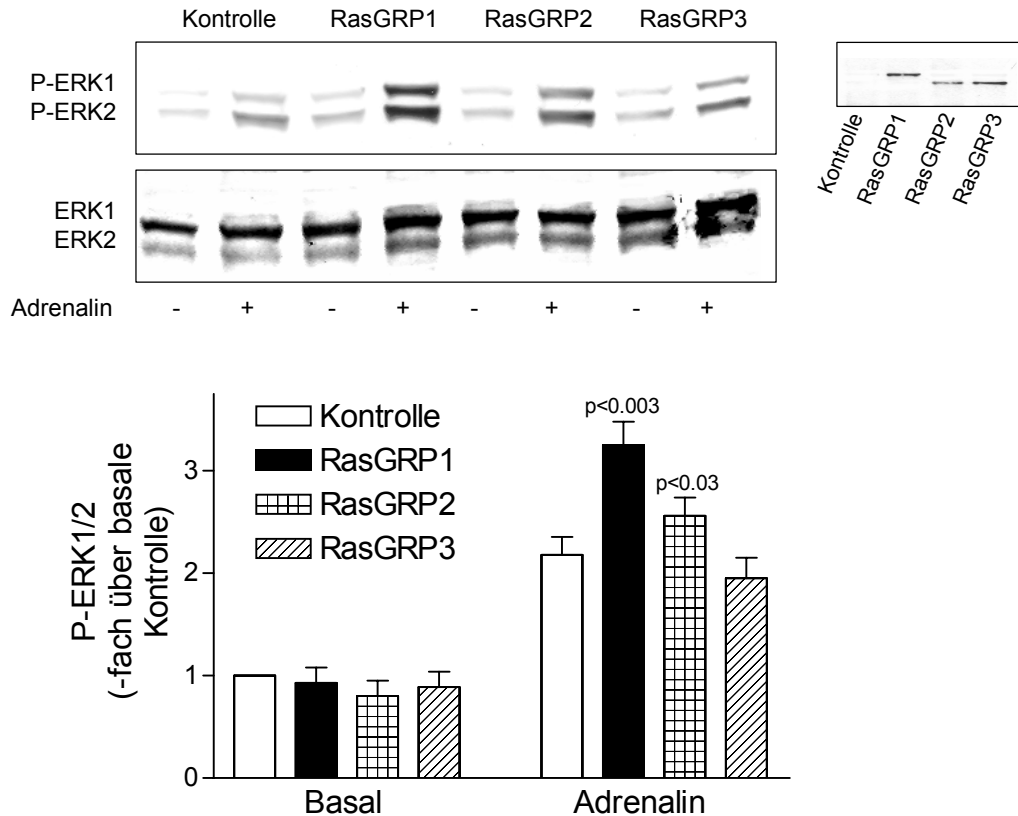
Template-Sequenz	genomisches Amplifikat	mRNA-Amplifikat
RasGRP1 (NT_010194)	1004 bp	153 bp
RasGRP2 (NT_033903)	416 bp	212 bp
RasGRP3 (NT_022184)	512 bp	206 bp





**Abb. 39: Endogene Expression von RasGRP1-3 in HEK-293-Zellen.** Spur 1-3: RasGRP-spezifische PCR-Produkte aus PCR mit genomischer DNA als Template. Spur 4-6: RasGRP-spezifische PCR-Produkte aus RT-PCR mit mRNA aus HEK-293-Zellen als Template. Der DNA-Größenstandard ist angegeben. **Tabelle:** Berechnete Fragmentgrößen der PCR-Produkte.

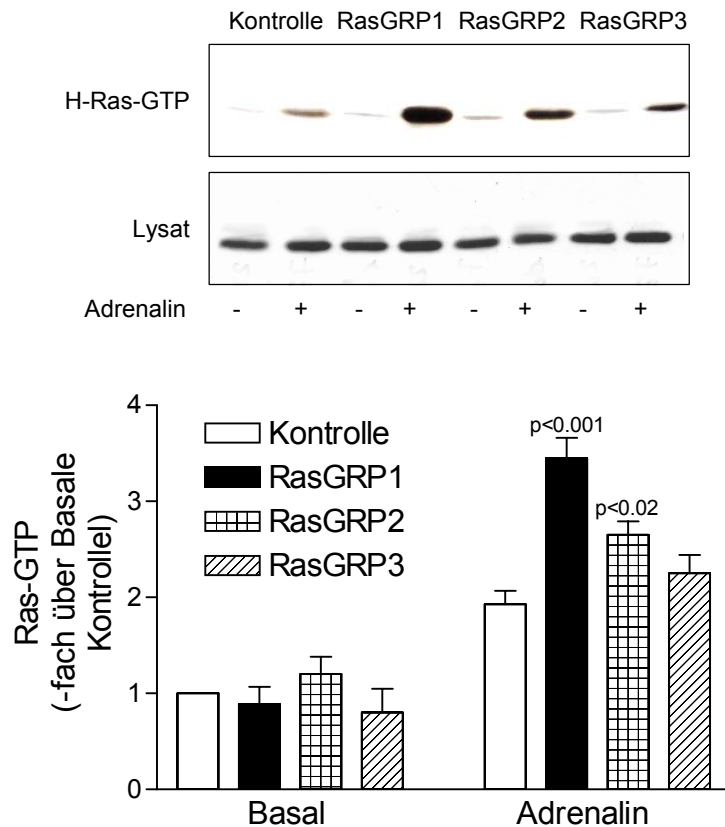
Nun wurden RasGRP1-3 in den Zellen überexprimiert und die Effekte auf die Aktivierung von ERK1/2 durch den  $\beta_2$ -AR geprüft. Wie in der Abb. 40 dargestellt, steigerte die Überexpression von RasGRP1 die Aktivierung von ERK1/2 durch Adrenalin drastisch. Dagegen wurde durch Überexpression von RasGRP2 und RasGRP3 diese Zellantwort kaum bzw. nicht verändert. Die basale ERK-Aktivität wurde durch kein Mitglied der RasGRP-Familie verändert.



**Abb. 40: Steigerung der  $\beta_2$ -AR-induzierten Aktivierung von ERK1/2 durch RasGRP1.**  $\beta_2$ -AR-exprimierende HEK-293-Zellen wurde mit RasGRP1, RasGRP2 oder RasGRP3 (jeweils 25  $\mu$ g cDNA) kotransfiziert. Die Zellen wurden für 5 min ohne (-, Basal) und mit 10  $\mu$ M Adrenalin stimuliert. Nachfolgend wurden der Gehalt an P-ERK1/2 und der Gesamtgehalt an ERK1/2 bestimmt. Im oberen Teil der Abbildung ist ein typisches Experiment dargestellt. Für die quantitative Auswertung der Daten ( $n = 6$ ) wurde der Gehalt an P-ERK1/2 in unstimulierten Zellen zu 1 gesetzt. Inset: Nachweis der Expression von HA-getaggtten RasGRP1, RasGRP2 und RasGRP3.

In ähnlicher Weise wie die ERK-Aktivierung wurde auch die Aktivierung von H-Ras durch den  $\beta_2$ -AR durch Überexpression von RasGRP1 gesteigert. Wie in der Abb. 41 dargestellt, wurde die durch Adrenalin induzierte Aktivierung von H-Ras durch Überexpression von RasGRP1 in etwa verdoppelt. RasGRP2 war deutlich schwächer wirksam, und die Überexpression von RasGRP3 war ohne Effekt. Diese Daten sprechen dafür, dass das  $\text{Ca}^{2+}$ -regulierte RasGRP1 in die Aktivierung von H-Ras mit nachfolgender Aktivierung von ERK1/2 durch den  $\beta_2$ -AR eingeschaltet ist.

Dagegen ist das hier unwirksame RasGRP3 offensichtlich in die Stimulation der PLC- $\epsilon$  durch den EGF-Rezeptor eingeschaltet, wie unsere Arbeitsgruppe kürzlich zeigen konnte (Stope *et al.*, 2004).

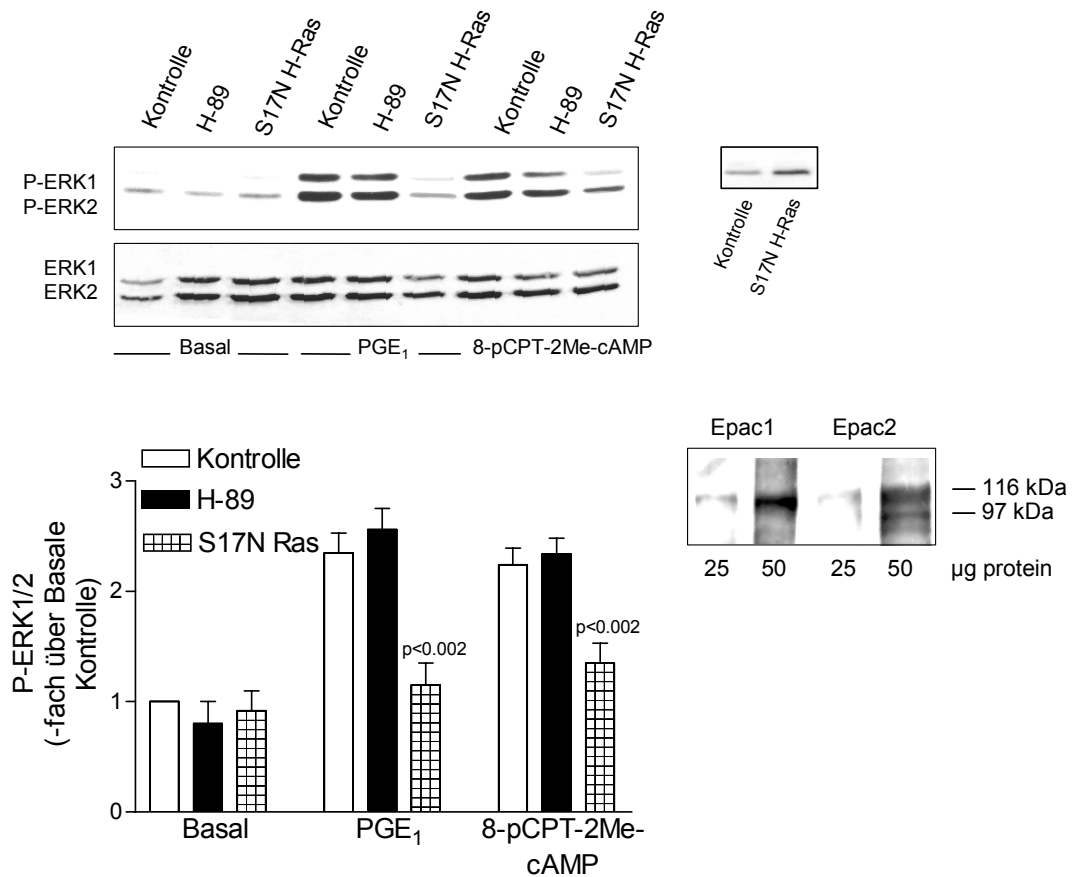


**Abb. 41: Steigerung der  $\beta_2$ -AR-induzierten Aktivierung von H-Ras durch RasGRP1.**  $\beta_2$ -AR-exprimierende HEK-293-Zellen wurde mit Wildtyp-H-Ras (50  $\mu$ g cDNA) allein (*Kontrolle*) oder zusammen mit RasGRP1, RasGRP2 oder RasGRP3 (jeweils 25  $\mu$ g cDNA) kotransfiziert. Die Zellen wurden für 5 min ohne (-, *Basal*) und mit 10  $\mu$ M Adrenalin stimuliert. Nachfolgend wurden der Gehalt an H-Ras-GTP und der Gesamtgehalt an H-Ras (*Lysat*) (**B**) bestimmt. Die gezeigten Immunoblots stellen typische Experimente dar. Für die quantitative Auswertung der Daten ( $n = 4$ ) wurde der Gehalt an H-Ras-GTP in unstimulierten Zellen zu 1 gesetzt.

## 4.5 Epac- und $\text{Ca}^{2+}$ -kontrollierte Aktivierung von H-Ras und ERK1/2 durch $\text{PGE}_1$ in Neuroblastomzellen

Unsere Arbeitsgruppe hat in früheren Untersuchungen zeigen können, dass nicht nur der in HEK-293-Zellen exprimierte  $\beta_2$ -AR, sondern auch der in N1E-115-Neuroblastomzellen endogen exprimierte  $\text{PGE}_1$ -Rezeptor über Epac-Proteine und Rap2B zur Stimulation der PLC- $\epsilon$  führt und nachfolgend  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale induziert (Schmidt *et al.*, 2001; vom Dorp *et al.*, 2004). Daher war es nun von Interesse zu prüfen, ob und inwieweit der für den  $\beta_2$ -AR in HEK-293-Zellen charakterisierte neue ERK-Signalweg auch durch den  $\text{G}_s$ -gekoppelten  $\text{PGE}_1$ -Rezeptor in N1E-115-Neuroblastomzellen beschriftet wird und, wenn ja, ob die Signalweiterleitung über ähnliche Komponenten wie in den HEK-293-Zellen erfolgt.

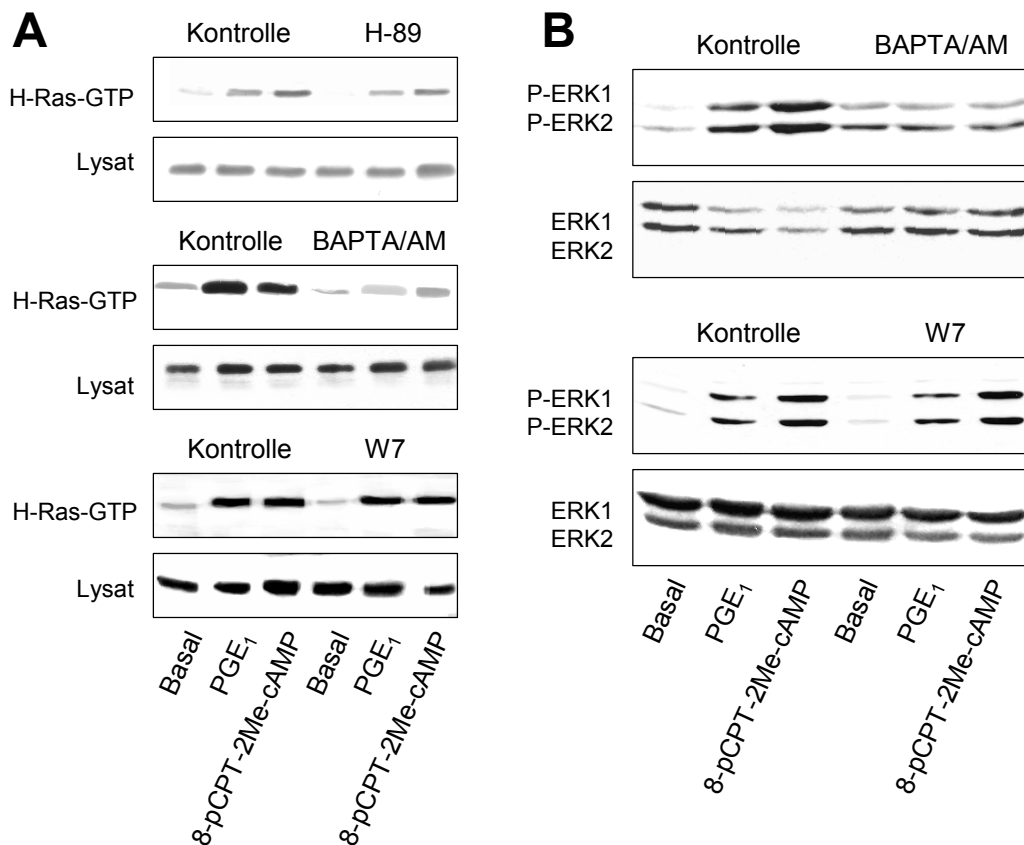
Wie in der Abb. 42 dargestellt, führte eine Stimulation der N1E-115-Zellen mit  $\text{PGE}_1$  (1  $\mu\text{M}$ ) zu einer starken Aktivierung von ERK1 und ERK2. Eine Vorbehandlung der Zellen mit dem PKA-Inhibitor H-89 (10  $\mu\text{M}$ ) reduzierte weder die basale ERK-Aktivität noch die Aktivierung von ERK1/2 durch  $\text{PGE}_1$  (Abb. 42). Somit erfolgt die Aktivierung von ERK1/2 durch den cAMP-generierenden  $\text{PGE}_1$ -Rezeptor in N1E-115-Neuroblastomzellen offensichtlich unabhängig von der PKA. Weiterhin ähnlich wie in HEK-293-Zellen bewirkte das Epac-spezifische cAMP-Analog 8-pCPT-2-Me-cAMP (10  $\mu\text{M}$ ) eine starke Aktivierung von ERK1 und ERK2 auch in N1E-115-Neuroblastomzellen, die endogen Epac1 und Epac2 exprimieren (Abb. 42). Schließlich wurde ähnlich wie in HEK-293-Zellen auch in N1E-115-Neuroblastomzellen die Rezeptor- und Epac-induzierte Aktivierung von ERK1/2 durch Expression von dominant negativem S17N H-Ras drastisch reduziert (Abb. 42). S17N H-Ras hatte keinen Einfluss auf die basale ERK-Aktivität, und auch der Gesamtgehalt an ERK-Kinasen wurde durch die Expression von S17N H-Ras nicht verändert. Eine Stimulation des  $\text{PGE}_1$ -Rezeptors und direkte Aktivierung von Epac-Proteinen durch 8-pCPT-2Me-cAMP aktivierte nicht nur ERK1/2, sondern auch H-Ras, ein Effekt der ähnlich wie die ERK-Aktivierung H-89-insensitiv war (Abb. 43A). Somit scheint der endogen in N1E-115-Neuroblastomzellen exprimierte  $\text{PGE}_1$ -Rezeptor, ähnlich wie der in HEK-293-Zellen transient exprimierte  $\beta_2$ -AR, über cAMP-aktivierte Epac-Proteine H-Ras zu aktivieren, das dann die Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 triggert.



**Abb. 42: PKA-unabhängige, jedoch Epac- und H-Ras-abhängige Aktivierung von ERK1 und ERK2 durch PGE<sub>1</sub> in N1E-115-Neuroblastomzellen.** N1E-115-Neuroblastomzellen wurden ohne (*Kontrolle*, *H-89*) und mit S17N H-Ras (100 µg cDNA) transfiziert. Die Zellen wurden mit 0,1 % (v/v) DMSO (*Kontrolle*) oder 10 µM H-89 für 15 min vorbehandelt. Danach wurden die Zellen für 5 min ohne (*Basal*) und mit 1 µM PGE<sub>1</sub> oder 10 µM 8-pCPT-2Me-cAMP stimuliert. Nachfolgend wurden der Gehalt an P-ERK1/2 und der Gesamtgehalt an ERK1/2 bestimmt. Im oberen Teil der Abbildung ist ein typisches Experiment dargestellt. Für die quantitative Auswertung der Daten ( $n = 4$ ) wurde der Gehalt an P-ERK1/2 in unstimulierten Zellen zu 1 gesetzt. Inset: Nachweis der Expression von S17N H-Ras sowie der endogenen Expression von Epac1 und Epac2 in Membranen der Zellen.

Schließlich wurde geprüft, ob und inwieweit die Agonist-induzierte Aktivierung von H-Ras und ERK1/2  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig ist. Wie in der Abb. 43A dargestellt, wurde durch eine Vorbehandlung der Zellen mit dem intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelator BAPTA/AM (20 µM) die Aktivierung von H-Ras durch PGE<sub>1</sub> ( $n = 5$ ;  $p < 0.002$ ) und 8-pCPT-2Me-cAMP ( $n = 4$ ;  $p < 0.004$ ) drastisch reduziert. Dagegen hatte der

Calmodulin-Antagonist W7 (100  $\mu\text{M}$ ) keinen Effekt. Ein ähnliches Bild ergab sich bei Betrachtung der Agonist-induzierten ERK-Aktivierung. Durch eine Vorbehandlung der Zellen mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelator BAPTA/AM wurde die Aktivierung von ERK1/2 durch  $\text{PGE}_1$  ( $n = 6$ ;  $p < 0.004$ ) und 8-pCPT-2Me-cAMP ( $n = 4$ ;  $p < 0.003$ ) nahezu komplett unterdrückt, während der Calmodulin-Antagonist W7 keine Wirkung zeigte (Abb. 43B). Somit scheint die Epac-abhängige Aktivierung von H-Ras und ERK1/2 durch  $\text{PGE}_1$  in N1E-115-Neuroblastomzellen  $\text{Ca}^{2+}$ -, jedoch nicht  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängig zu sein. In zukünftigen Experimenten wird insbesondere zu klären sein, welches  $\text{Ca}^{2+}$ -regulierte GEF für die Aktivierung von H-Ras und die nachfolgende ERK-Aktivierung verantwortlich ist.



**Abb. 43:  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Aktivierung von H-Ras und ERK1/2 durch  $\text{PGE}_1$  in N1E-115-Neuroblastomzellen.** N1E-115-Neuroblastomzellen wurden mit 0,2 % (v/v) DMSO (Kontrolle), 10  $\mu\text{M}$  H-89, 20  $\mu\text{M}$  BAPTA/AM oder 100  $\mu\text{M}$  W7 für 15 min wie angegeben vorbehandelt. Die Zellen wurden dann für 5 min ohne (Basal) und mit 1  $\mu\text{M}$   $\text{PGE}_1$  oder 10  $\mu\text{M}$  8-pCPT-2Me-cAMP stimuliert. Nachfolgend wurden der Gehalt an H-Ras-GTP, der Gesamtgehalt an H-Ras (Lysat) (A), der Gehalt an P-ERK1/2 und der Gesamtgehalt an ERK1/2 (B) bestimmt. Dargestellt sind typische Experimente ( $n = 5-6$ ).

## 5. Diskussion

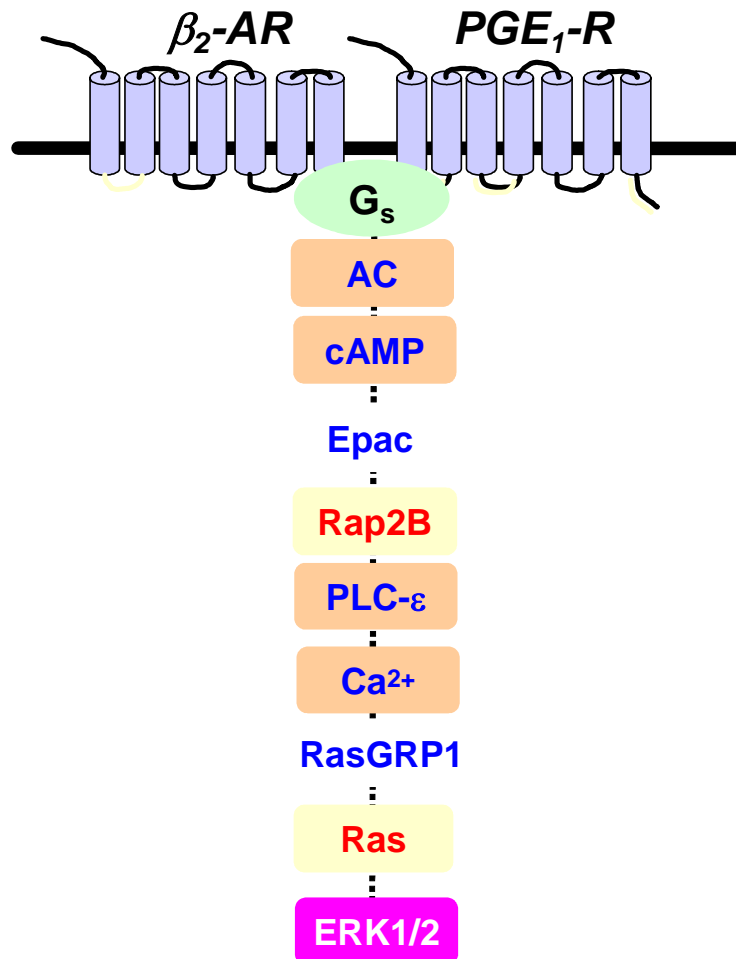
Die Aktivität der MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 (ERK1/2), die wichtige zelluläre Prozesse, wie Zellwachstum, -differenzierung und -transformation entscheidend beeinflussen können, wird durch eine große Zahl von  $G_s$ -gekoppelten Rezeptoren in einer Vielzahl von Zellen reguliert (Gutkind, 2000; Pearson *et al.*, 2001; Johnson & Lapadat, 2002). In vielen Zellen bewirkt eine Stimulation der  $G_s$ -gekoppelten Rezeptoren infolge der Bildung des *second messenger* cAMP und Aktivierung der PKA eine Hemmung von ERK1/2 durch Wachstumsfaktoren. Dagegen wird insbesondere in neuronalen und endokrinen Zellen die Aktivität der MAP-Kinasen durch  $G_s$ -gekoppelte Rezeptoren positiv beeinflusst. Auch für diese Regulation von ERK1/2 scheint der wesentliche zelluläre cAMP-Effektor, die cAMP-regulierte PKA, von zentraler Bedeutung zu sein (Richards, 2001; Beavo & Brunton, 2002; Stork & Schmitt, 2002). Besonders intensiv wurden die Mechanismen der Aktivierung von ERK1/2 durch den  $\beta_2$ -AR, einem typischen  $G_s$ -gekoppelten Rezeptor, in HEK-293-Zellen durch die Arbeitsgruppen um Stork und Lefkowitz untersucht. Basierend auf diesen Untersuchungen wurden zwei PKA-abhängige Modelle der ERK-Aktivierung durch diesen Rezeptor etabliert (Lefkowitz *et al.*, 2002; Stork & Schmitt, 2002). Beide Modelle der Aktivierung von ERK1/2 durch den  $\beta_2$ -AR weisen wichtige Unterschiede hinsichtlich der beteiligten molekularen Mechanismen und Komponenten auf. Lefkowitz und Kollegen zeigten, dass der  $\beta_2$ -AR durch die PKA phosphoryliert wird und dass der phosphorylierte Rezeptor nun bevorzugt an  $G_i$ -Proteine koppelt, aus denen nachfolgend  $G\beta\gamma$ -Dimere freigesetzt werden, die dann unter Einschaltung der zytosolischen Tyrosinkinase c-Src zur Aktivierung von Ras führen, das über die MAP-Kinase-Kinase-Kinase Raf-1 die MAP-Kinasen ERK1 und ERK stimuliert (Daaka *et al.*, 1997; Lefkowitz *et al.*, 2002). Dieser Prozess wird, wie kürzlich gezeigt, durch eine  $\beta$ -Arrestin-abhängige Translokation der Phosphodiesterase 4 an die Plasmamembran und damit Modulation der PKA-Aktivierung reguliert (Baillie *et al.*, 2003). Dagegen zeigten Schmitt und Stork, dass der  $\beta_2$ -AR unabhängig von  $G_i$ -Proteinen zur Aktivierung von ERK1/2 führt, nämlich durch eine PKA-induzierte Phosphorylierung von c-Src und nachfolgende Aktivierung der Ras-verwandten GTPase Rap1, die dann über B-Raf die Aktivierung der MAP-Kinasen induziert (Schmitt & Stork, 2000; Schmitt & Stork, 2002a).

In jüngster Zeit gab es jedoch mehrere Berichte, die zeigten, dass G<sub>s</sub>-gekoppelte Rezeptoren die MAP-Kinasen auch unabhängig von der PKA aktivieren können. So wurde z.B. berichtet, dass die Aktivierung von ERK1/2 durch den Thyrotropin-Rezeptor in FRTL5-Zellen cAMP-abhängig ist, jedoch unabhängig von der PKA erfolgt (Iacovelli *et al.*, 2001). Auch die cAMP-abhängige Aktivierung von ERK1/2 durch den Parathormon-Rezeptor in den Knochenzellen MC3T3-E1 und ATDC5 wurde offensichtlich nicht durch die PKA vermittelt (Fujita *et al.*, 2002). Diese Rezeptoren induzierten die ERK-Aktivierung anscheinend durch Kopplung an Rap1 und B-Raf (Iacovelli *et al.*, 2001; Fujita *et al.*, 2002). Auch in nativen Nierenzellen der Ratte wurde eine PKA-unabhängige ERK-Aktivierung durch Calcitonin beobachtet, die durch Rap1 und B-Raf vermittelt wurde (Larouche-Joubert *et al.*, 2002). Diese Autoren erbrachten darüber hinaus mittels eines Epac-spezifischen Antikörpers erste Hinweise dafür, dass cAMP-aktivierte Epac-Proteine in die ERK-Aktivierung durch Calcitonin eingeschaltet sind (Larouche-Joubert *et al.*, 2002). Auch bei der ERK-Aktivierung durch den G<sub>s</sub>-gekoppelten 5-Hydroxytryptamin-7-Rezeptor in kultivierten Neuronen des Hippocampus der Ratte und PC-12-Zellen scheinen Epac-Proteine beteiligt zu sein (Lin *et al.*, 2003). Aufbauend auf den Untersuchungen von Koida und Kollegen wurde kürzlich gezeigt, dass die cAMP-abhängige, jedoch PKA-unabhängige ERK-Aktivierung durch den Parathormon-Rezeptor in Osteoblasten durch Epac vermittelt wird (Chen *et al.*, 2004). Schliesslich zeigten Ballotti und Kollegen, dass die cAMP-abhängige Aktivierung von Ras, nicht jedoch von Rap1, in humanen Melanozyten und B16-Mausmelanom-Zellen PKA-unabhängig erfolgt (Buscá *et al.*, 2000). Alle diese Befunde sprechen dafür, dass die Aktivierung von ERK1/2 und Ras durch cAMP-generierende G<sub>s</sub>-gekoppelte Rezeptoren neben der PKA auch durch andere, neue cAMP-Effektoren vermittelt werden kann (Beavo & Brunton, 2002; Springett *et al.*, 2004).

Unsere Arbeitsgruppe zeigte kürzlich, dass der  $\beta_2$ -AR und der PGE<sub>1</sub>-Rezeptor, zwei G<sub>s</sub>-gekoppelte Rezeptoren, über vermehrte Bildung von cAMP durch die AC Epac-Proteine aktivieren. Diese direkt durch cAMP, unabhängig von der PKA aktivierten Austauschfaktoren für Rap-GTPasen führten dann über die GTPase Rap2B zur Stimulation der PLC- $\epsilon$  mit nachfolgender [Ca<sup>2+</sup>]-Erhöhung (Schmidt *et al.*, 2001; vom Dorp *et al.*, 2004). Es war deshalb von großem Interesse zu prüfen, ob dieser neue Signalweg G<sub>s</sub>-gekoppelter Rezeptoren bei der Aktivierung von ERK1/2 durch diese Rezeptoren beteiligt ist. Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten



Ergebnisse zeigen, dass  $G_s$ -gekoppelte Rezeptoren in der Tat über cAMP-aktivierte Epac-Proteine und nachfolgende Stimulation der PLC- $\epsilon$  über ein  $Ca^{2+}$ -reguliertes Ras-GEF (RasGRP1) zur Aktivierung von H-Ras und der MAP-Kinasen ERK1/2 führen können (Abb. 44).



**Abb. 44: Ein neuer Signalweg  $G_s$ -gekoppelter Rezeptoren: Aktivierung von Ras und ERK1/2 durch Epac und Calcium.** Weitere Erläuterungen siehe Text.

Diese Hypothese basiert auf den folgenden Ergebnissen: Eine Stimulation des transient in HEK-293-Zellen exprimierten  $\beta_2$ -ARs mit dem Agonisten Adrenalin führte zu einer schnellen und transienten Aktivierung von ERK1/2. Die durch Adrenalin induzierte ERK-Aktivierung wurde durch den  $\beta$ -AR-Antagonisten Propranolol und durch die MAP-Kinase-Kinase (MEK)-Inhibitoren PD98059 und U0126 komplett unterdrückt. Aufbauend auf diesen Ergebnissen war es nun von Interesse zu prüfen, ob und inwieweit die Aktivierung von ERK1/2 durch den  $\beta_2$ -AR AC/cAMP-abhängig

ist und ob die PKA, G<sub>i</sub>-Proteine und aus ihnen freigesetzte Gβγ-Dimere, c-Src, Rap1 und/oder H-Ras an diesem Prozess beteiligt sind. Die Signalweiterleitung G<sub>s</sub>-gekoppelter Rezeptoren erfolgt in den meisten Fällen über die Aktivierung von Mitgliedern der AC-Familie mit nachfolgender Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration. Eine Stimulation der HEK-293-Zellen mit dem direkten AC-Aktivator Forskolin führte ähnlich wie der β<sub>2</sub>-AR-Agonist Adrenalin, jedoch mit einer etwas anderen zeitlichen Kinetik, zur Aktivierung von ERK1/2. Dagegen wurde die ERK-Aktivierung durch den β<sub>2</sub>-AR und Forskolin durch Hemmung der AC durch den direkten AC-Inhibitor 2'5'-Didesoxyadenosin unterdrückt. Dies sprach dafür, dass die Aktivierung von ERK1/2 durch den β<sub>2</sub>-AR durch AC/cAMP-abhängige Signale vermittelt wird. Eine Vorbehandlung der HEK-293-Zellen mit den PKA-Inhibitoren H-89 und Rp-8-CPT-cAMPS (Chijiwa *et al.*, 1990; Gjertsen *et al.*, 1995) hatte jedoch keinen Effekt auf die Aktivierung von ERK1/2 durch Adrenalin und Forskolin. Ähnliche negative Ergebnisse wurden mit H-89 für die cAMP-abhängige ERK-Aktivierung durch den Thyrotropin-Rezeptor in FRTL5-Zellen und den Parathormon-Rezeptor in MC3T3-E1- und ATDC5-Zellen erhoben (Iacovelli *et al.*, 2001; Fujita *et al.*, 2002), während Daaka *et al.* (1997) und Schmitt und Stork (2000) zeigten, dass der PKA-Inhibitor die Aktivierung von ERK1/2 durch den β<sub>2</sub>-AR in HEK-293-Zellen blockiert. Aus diesen Daten kann geschlossen werden, dass die cAMP-aktivierte PKA für die Aktivierung von ERK1/2 durch den β<sub>2</sub>-AR in den von uns eingesetzten HEK-293-Zellen im Gegensatz zu den von den Gruppen um Lefkowitz und Stork benutzten Zellen keine Rolle spielt. Eine Inaktivierung von G<sub>i</sub>-Proteinen durch PTX und eine Sequestrierung von Gβγ-Dimeren durch Expression des C-Terminus der β-Adrenozeptorkinase veränderten die Aktivierung von ERK1/2 durch den β<sub>2</sub>-AR ebenfalls nicht. Somit scheint der β<sub>2</sub>-AR in unseren Zellen durch Kopplung an G<sub>s</sub>-Proteine und nachfolgende Aktivierung von neuen cAMP-regulierten Effektoren die ERK-Aktivierung zu ermöglichen. Eine Vorbehandlung der HEK-293-Zellen mit dem c-Src-Inhibitor PP2 sowie die Expression einer inaktiven c-Src-Mutante blieben ebenfalls ohne wesentliche Effekte auf die Aktivierung von ERK1/2 durch den β<sub>2</sub>-AR, was gegen eine Beteiligung der zytosolischen Tyrosinkinase c-Src sprach. Die cAMP-abhängige, jedoch PKA-unabhängige Aktivierung von ERK1/2 durch den Thyrotropin-Rezeptor in FRTL5-Zellen und den Parathormon-Rezeptor in MC3T3-E1- und ATDC5-Zellen benötigte die GTPase Rap1 (Iacovelli *et al.*, 2001; Fujita *et*

*al.*, 2002), ähnlich wie von Schmitt und Stork (2000) für die PKA-abhängige ERK-Aktivierung durch den  $\beta_2$ -AR in HEK-293-Zellen berichtet. In dieser Arbeit wird jedoch gezeigt, dass die durch Adrenalin induzierte ERK-Aktivierung durch Expression einer dominant negativen H-Ras-Mutante, nicht jedoch durch Expression einer dominant negativen Rap1A-Mutante unterdrückt wird. Zudem wurde durch Einsatz der *Pull-down*-Technik gezeigt, dass Adrenalin und Forskolin H-Ras aktivieren, d.h. die GTP-Beladung dieses Proteins steigern. Somit weist die hier beobachtete Aktivierung von ERK1/2 durch den  $\beta_2$ -AR in HEK-293-Zellen Charakteristika auf, die sich deutlich von den von Stork und Lefkowitz etablierten Modellen unterscheiden. Die Aktivierung der MAP-Kinasen durch den  $\beta_2$ -AR erfolgt über H-Ras und benötigt statt der PKA offensichtlich andere cAMP-regulierte Effektoren.

Unsere Arbeitsgruppe hatte gezeigt, dass die Signalweiterleitung über den  $\beta_2$ -AR in HEK-293-Zellen über cAMP-aktivierte Epac-Proteine erfolgen kann (Schmidt *et al.*, 2001; Evellin *et al.*, 2002; vom Dorp *et al.*, 2004). Im Einklang damit wird hier gezeigt, dass durch Überexpression von Epac1 in HEK-293-Zellen, die endogen Epac1 und Epac2 exprimieren, die Aktivierung von ERK1/2 und H-Ras (nicht gezeigt) durch Adrenalin verstärkt wird. Eine Stimulation der HEK-293-Zellen mit 8-pCPT-2Me-cAMP, einem kürzlich identifizierten Epac-spezifischen cAMP-Analog (Enserink *et al.*, 2002), imitierte nicht nur die stimulatorischen Effekte von Adrenalin auf die PLC- und  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale, sondern führte auch zu einer Aktivierung von ERK1/2. Die ERK-Aktivierung durch das Epac-spezifische cAMP-Analog erfolgte bei ähnlichen Konzentrationen wie die Aktivierung von Epac1 *in vitro* (Enserink *et al.*, 2002; Christensen *et al.*, 2003; Rehmann *et al.*, 2003b). McCauley und Kollegen zeigten kürzlich, dass 8-pCPT-2Me-cAMP zu einer Aktivierung von ERK1/2 in Osteoblasten führt, eine Effekt, der durch Rap1 und B-Raf vermittelt wurde (Chen *et al.*, 2004). Hingegen hatten Bos und Kollegen kürzlich gezeigt, dass eine direkte Aktivierung von Epac-Proteinen durch 8-pCPT-2Me-cAMP in verschiedenen kultivierten Zellen zwar zu einer Aktivierung von Rap1, jedoch nicht zu einer ERK-Aktivierung führt, woraus die Autoren schlossen, dass eine Epac-abhängige Aktivierung von Rap1 nicht generell zu einer ERK-Aktivierung durch  $G_s$ -gekoppelte Rezeptoren führt (Enserink *et al.*, 2002).

Die stimulatorischen Effekte von 8-pCPT-2Me-cAMP auf den ERK-Signalweg wurden durch Expression von dominant negativem H-Ras unterdrückt. Dies sprach

dafür, dass H-Ras *downstream* von Epac-Proteinen auf dem Signalweg zur Aktivierung der MAP-Kinasen liegt. Im Einklang damit wurde gefunden, dass 8-pCPT-2Me-cAMP H-Ras aktiviert. Zur Ausschaltung der Funktion der endogen exprimierten Epac-Proteine wurde ein molekularbiologischer Ansatz gewählt. Durch ortsgerichtete Mutagenese wurde eine cAMP-Bindungs-defiziente R279K Epac1-Mutante hergestellt. Es ist bekannt, dass durch den Austausch hochkonservierter Argininreste in den cAMP-Bindungsdomänen von Epac1 und Epac2 inaktive, cAMP-Bindungs-defiziente Mutanten generiert werden, die Rap-Proteine nicht mehr aktivieren (Kawasaki *et al.*, 1998; Ozaki *et al.*, 2000; Rehmann *et al.*, 2003a). Durch Expression dieser Epac1-Mutante wurde die Aktivierung von H-Ras und ERK1/2 durch den  $\beta_2$ -AR unterdrückt. Weiterhin wird gezeigt, dass durch Expression von RapGAPII, einem spezifischen Rap-Inhibitor (de Bruyn *et al.*, 2002), diese Hemmeffekte der Epac1-Mutante imitiert werden. Diese Daten sprachen dafür, dass zwischen den Epac-Proteinen und H-Ras eine Rap-GTPase, nicht jedoch Rap1A (siehe oben), lokalisiert ist. Da frühere Untersuchungen gezeigt hatten, dass die Aktivierung der PLC- $\epsilon$  durch Epac-Proteine über die Rap-GTPase Rap2B verläuft (Schmidt *et al.*, 2001; Evellin *et al.*, 2002; vom Dorp *et al.*, 2004), wurde geprüft, ob diese Rap-GTPase auch in die Aktivierung von H-Ras und ERK1/2 durch den  $\beta_2$ -AR eingeschaltet ist. Durch Expression einer konstitutiv aktiven Rap2B-Mutante wurden H-Ras und ERK1/2 aktiviert, wobei die ERK-Aktivierung durch Koexpression von dominant negativem H-Ras revertiert wurde. Zudem wurde durch Expression einer dominant negativen Rap2B-Mutante die Aktivierung von H-Ras und ERK1/2 durch den  $\beta_2$ -AR sowie die Potenzierung dieser Zellantworten durch Überexpression von Wildtyp-Epac1 komplett unterdrückt. Weiterhin wird gezeigt, dass durch Expression von RapGAPII oder der cAMP-Bindungs-defizienten Epac1-Mutante die Aktivierung von Rap2B durch den  $\beta_2$ -AR unterdrückt wird. An dieser Stelle kann also Folgendes festgehalten werden: Erstens, die cAMP-abhängige Aktivierung von ERK1/2 durch den transient in HEK-293-Zellen exprimierten  $\beta_2$ -AR erfolgt über Epac-Proteine und die GTPasen H-Ras und Rap2B. Zweitens, H-Ras liegt *upstream* von ERK1/2, aber offensichtlich *downstream* von Rap2B.

In HEK-293-Zellen, die endogen Epac1 und Epac2 exprimieren, wurden mit der cAMP-Bindungs-defizienten Epac1-Mutante offensichtlich dominant negative Effekte erzielt. Ähnlich starke Hemmeffekte von cAMP-Bindungs-defizienten Epac-

Mutanten wurden bei der Insulinsekretion in  $\beta$ -Zellen des Pankreas und der Exozytose in PC-12-Zellen beobachtet (Ozaki *et al.*, 2000; Holz, 2004). Interessant erscheint in diesem Zusammenhang auch, dass Epac-Proteine direkt mit verschiedenen Proteinen, wie ATP-sensitiven Kaliumkanäle interagieren können (Holz, 2004) und zudem eine Zellzyklus-abhängige subzelluläre Umverteilung dieser Proteine beschrieben wurde (Qiao *et al.*, 2002). Dies lässt mutmaßen, dass Epac-Proteine evtl. auch als *Scaffold*-Proteine in die zelluläre Signalweiterleitung eingreifen und dass durch Expression cAMP-Bindungs-defizienter Epac-Mutanten diese Funktionen unterdrückt werden. Die Bedeutung der Epac-Proteine für die Signalweiterleitung von Rezeptoren ist bisher noch relativ wenig untersucht. Unsere Arbeitsgruppe hat in der jüngsten Zeit Hinweise dafür erhalten, dass Aktivierung von Epac-Proteinen im kardiovaskulärem System Zellfunktionen nicht stimuliert, sondern hemmt. So wurde in menschlichen Thrombozyten die durch Thromboxan  $A_2$  induzierte Aggregation durch Epac-Aktivierung gehemmt, ähnlich wie die durch Thromboxan  $A_2$  induzierte Kontraktion von Aortenringen der Ratte (nicht gezeigt). Dies bedeutet, dass die cAMP-regulierten Epac-Proteine ähnlich wie die PKA Zellantworten sowohl aktivieren als auch hemmen können (Richards, 2001; Beavo & Brunton, 2002; Stork & Schmitt, 2002; Bos, 2003; Springett *et al.*, 2004). Diese differentielle Regulation der cAMP-abhängigen Signalweiterleitung wird vermutlich durch ein hohes Maß zellulärer Kompartimentierung erzielt (Zaccolo *et al.*, 2002; Ostrom & Insel, 2004).

Unsere Arbeitsgruppe hatte gezeigt, dass die PLC- $\epsilon$  ein Effektormolekül von Rap2B darstellt (Schmidt *et al.*, 2001; Stope *et al.*, 2004). Die PLC- $\epsilon$  hat als einziger Vertreter der PLC-Familie zwei katalytische Funktionen. So besitzt sie wie alle anderen PLC-Isoformen Lipaseaktivität, die in den hochkonservierten X/Y-Domänen lokalisiert ist. Gleichzeitig kann die PLC- $\epsilon$  aufgrund der N-terminal lokalisierten CDC25-Domäne Ras-ähnliche GTPasen aktivieren (Cullen, 2001; Cullen & Lockyer, 2002; Quilliam *et al.*, 2002). Lomasney und Kollegen zeigten, dass über die PLC- $\epsilon$  Ras und ERK1/2 aktiviert werden können (Lopez *et al.*, 2001). Zudem zeigten Kataoka und Kollegen, dass die PLC- $\epsilon$  durch Aktivierung von Rap1A entscheidend in die Stimulation von ERK1/2 eingreifen kann (Jin *et al.*, 2001). Um zu prüfen, ob und über welchen Mechanismus die PLC- $\epsilon$  in die Aktivierung von H-Ras und ERK1/2 durch den  $\beta_2$ -AR eingeschaltet ist, wurde einerseits die Wildtyp-PLC- $\epsilon$  in den HEK-

293-Zellen überexprimiert und andererseits wurden zwei PLC- $\epsilon$ -Mutanten eingesetzt, nämlich eine Lipase-inaktive Mutante (Lopez *et al.*, 2001) sowie eine Mutante, bei der die CDC25-Domäne deletiert war ( $\Delta$ CDC25 PLC- $\epsilon$ ). Bislang gab es nur N-terminale Deletionsmutanten [Aminosäuren 1-1087; PLC- $\epsilon$   $\Delta$ N], bei denen der komplette N-Terminus inkl. der CDC25-Domäne deletiert war. Diese Deletion unterdrückte zwar die GEF-Aktivität der PLC- $\epsilon$  gegenüber Rap1A komplett; durch diese Deletion wurden jedoch auch die PH-Domäne sowie Abschnitte der *EF-Hands* entfernt (Jin *et al.*, 2001). Um Effekte dieser fehlenden Domänen auszuschließen, wurde in dieser Arbeit nur die CDC25-Domäne deletiert. Kontrolluntersuchungen zeigten, dass die Lipaseaktivität der CDC25-defizienten PLC- $\epsilon$  nicht beeinträchtigt war. Überraschenderweise wurde durch Expression von  $\Delta$ CDC25 PLC- $\epsilon$ , ähnlich wie durch Überexpression von Wildtyp-PLC- $\epsilon$ , die Aktivierung von H-Ras und ERK1/2 durch Adrenalin und 8-pCPT-2Me-cAMP verstärkt. Dagegen wurden diese Zellantworten durch Expression der Lipase-inaktiven PLC- $\epsilon$ -Mutante unterdrückt. Daraus kann gefolgert werden, dass die Aktivierung von H-Ras und ERK1/2 von der Lipaseaktivität der PLC- $\epsilon$  abhängig ist und dass die PLC- $\epsilon$ -spezifische CDC25-Domäne nicht das H-Ras-spezifische GEF darstellt.

Die Epac/Rap2B-abhängige Stimulation der PLC- $\epsilon$  durch den  $\beta_2$ -AR steigert die zelluläre Konzentration von  $\text{Ca}^{2+}$  und DAG (Schmidt *et al.*, 2001; vom Dorp *et al.*, 2004). Es stellte sich nun die Frage, welcher der durch die PLC- $\epsilon$  gebildeten *second messenger* für die Aktivierung von H-Ras und ERK1/2 verantwortlich ist. Hierfür wurden Hemmstoffversuche durchgeführt. Eine Vorbehandlung der Zellen mit einem Inhibitor DAG-sensitiver PKC-Isoformen hatte keinen Effekt, was gegen eine Beteiligung von DAG und seinen wichtigsten zellulären Effektoren sprach. Dagegen wurde die durch Adrenalin und 8-pCPT-2Me-cAMP induzierte Aktivierung von H-Ras und ERK1/2 durch den intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelator BAPTA/AM praktisch vollständig unterdrückt. Diese Daten sprachen dafür, dass ein  $\text{Ca}^{2+}$ -reguliertes GEF in die Epac-abhängige Aktivierung von H-Ras durch den  $\beta_2$ -AR eingeschaltet ist. Zwei Gruppen von Austauschfaktoren für Ras-GTPasen werden durch  $\text{Ca}^{2+}$  bzw.  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin reguliert: Dies sind die RasGRFs (GRF1 und GRF2), die spezifisch durch  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin aktiviert werden, und die  $\text{Ca}^{2+}$ /DAG-regulierten RasGRPs (GRP1-4) (Bos *et al.*, 2001; Cullen & Lockyer, 2002; Quilliam *et al.*, 2002; Springett *et al.*, 2004). Eine Vorbehandlung der Zellen mit den Calmodulin-Antagonisten W7,

Calmidazolium und Fluphenazin (Gietzen, 1983; Itoh & Hidaka, 1984; Alvarez *et al.*, 1991) veränderte weder die Aktivierung von ERK1/2 noch die H-Ras-Aktivierung durch Adrenalin. Somit scheinen die RasGRFs nicht von Bedeutung für den hier beschriebenen Signalweg zu sein. Im Einklang hiermit zeigten Feig und Kollegen kürzlich, dass RasGRFs nicht endogen in HEK-293-Zellen exprimiert werden (Tian *et al.*, 2004). Hingegen wurden durch Überexpression von RasGRP1, RasGRP2 und RasGRP3, deren endogene Expression in HEK-293-Zellen mittels RT-PCR in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen wurde, folgende Ergebnisse erzielt: Durch Expression von RasGRP1 wurde die Aktivierung von H-Ras und ERK1/2 durch den  $\beta_2$ -AR potenziert, während diese Zellantworten durch Überexpression von RasGRP2 und RasGRP3 kaum bzw. nicht verändert wurden. Die C-terminal lokalisierte *EF-Hand* und eine C1-Domäne sind offensichtlich für die  $\text{Ca}^{2+}$ - bzw. DAG-Sensitivität der RasGRPs verantwortlich (Bos *et al.*, 2001; Cullen & Lockyer, 2002; Quilliam *et al.*, 2002; Springett *et al.*, 2004). Im Einklang mit unseren Ergebnissen wurde gezeigt, dass die GEF-Aktivität von RasGRP1 anscheinend nur durch  $\text{Ca}^{2+}$  reguliert wird (Ebinu *et al.*, 1998). Daher erscheint es als sehr wahrscheinlich, dass RasGRP1 das  $\text{Ca}^{2+}$ -regulierte GEF darstellt, das als Mediator für die H-Ras-Aktivierung durch den  $\beta_2$ -AR in HEK-293-Zellen fungiert. In zukünftigen Experimenten ist zur weiteren Abklärung dieser Fragestellung der Einsatz von siRNA-Molekülen (Dykhooorn *et al.*, 2003) zur Ausschaltung von RasGRP1 geplant. Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Aktivierung von H-Ras erscheint insbesondere auf dem Hintergrund interessant, dass sich in der Literatur Hinweise mehren, die auf eine strikte Regulation Ras-abhängiger Signale durch  $\text{Ca}^{2+}$ -regulierte Austauschfaktoren und GAPs hinweisen (Walker *et al.*, 2003; Walker *et al.*, 2004).

Um eine generelle Bedeutung des in HEK-293-Zellen erarbeiteten ERK-Signalwegs zu belegen, wurde in einer anderen Zelllinie die Signaltransduktion eines weiteren  $\text{G}_s$ -gekoppelten Rezeptors charakterisiert, nämlich die des  $\text{PGE}_1$ -Rezeptors in N1E-115-Neuroblastomzellen. In unserer Arbeitsgruppe war in früheren Untersuchungen gezeigt worden, dass nach Stimulation dieses  $\text{G}_s$ -gekoppelten Rezeptors die endogen exprimierte PLC- $\epsilon$  über Epac-Proteine und Rap2B aktiviert und nachfolgend die zelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration gesteigert wird (Schmidt *et al.*, 2001; vom Dorp *et al.*, 2004). Daher wurde geprüft, ob nach Stimulation des  $\text{PGE}_1$ -Rezeptors H-Ras und ERK1/2 aktiviert werden und, wenn ja, ob die Signalweiterleitung über ähnliche Komponenten wie in den HEK-293-Zellen erfolgt.

In der Tat wurden durch Stimulation der Zellen mit  $\text{PGE}_1$  H-Ras und ERK1/2 aktiviert. Diese Zellantworten waren H-89-insensitiv. Vergleichbare Effekte wie mit  $\text{PGE}_1$  wurden mit dem Epac-spezifischen cAMP-Analog in diesen Zellen erzielt, die endogen Epac1 und Epac2 exprimieren. Die Aktivierung von ERK1/2 durch  $\text{PGE}_1$  wurde durch Expression der dominant negativen H-Ras-Mutante blockiert. Schliesslich wird gezeigt, dass die Aktivierung von H-Ras und ERK1/2 durch  $\text{PGE}_1$  und das Epac-spezifische cAMP-Analog durch intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelierung blockiert wird, während der Calmodulin-Antagonist W7 ohne Effekt blieb. Somit scheint die cAMP/Epac-abhängige Aktivierung von H-Ras und ERK1/2 durch den  $\text{PGE}_1$ -Rezeptor maßgeblich durch  $\text{Ca}^{2+}$  reguliert zu werden. In zukünftigen Experimenten ist geplant, das  $\text{Ca}^{2+}$ -regulierte GEF zu identifizieren, das in den Neuroblastomzellen die Aktivierung von H-Ras katalysiert. Vorläufige Ergebnisse zeigen, dass ähnlich wie in HEK-293-Zellen die Rezeptor-induzierte Aktivierung von H-Ras und ERK1/2 in N1E-115-Neuroblastomzellen durch Expression von Wildtyp-PLC- $\epsilon$  und  $\Delta\text{CDC25}$  PLC- $\epsilon$  gesteigert wird, während sie durch Expression der Lipase-inaktiven PLC- $\epsilon$ -Mutante gehemmt wird (nicht gezeigt). Somit scheint auch in diesen Zellen eine Aktivierung der PLC- $\epsilon$  von zentraler Bedeutung für die Regulation des ERK-Signalweges zu sein. Zudem unterstreichen diese Ergebnisse die Hypothese, dass die PLC- $\epsilon$ -spezifische CDC25-Domäne nicht das Ras-GEF ist, das H-Ras aktiviert.

Zusammenfassend kann als Resultat Folgendes gesagt werden: In der vorliegenden Arbeit wurde ein neuer Signalweg zur Aktivierung von H-Ras und der MAP-Kinasen ERK1/2 durch  $G_s$ -gekoppelte Rezeptoren charakterisiert. Dieser Signalweg wird nach Stimulation von zwei unterschiedlichen Rezeptoren in zwei unterschiedlichen Zellarten beschriftet, nämlich durch den transient in HEK-293-Zellen exprimierten  $\beta_2$ -AR und den endogen in N1E-115-Neuroblastomzellen exprimierten  $\text{PGE}_1$ -Rezeptor. Die cAMP-abhängige Aktivierung von H-Ras und der MAP-Kinasen benötigt nicht die PKA, sondern wird durch Epac-Proteine vermittelt. Diese durch cAMP aktivierten Rap-GEFs führen über Rap2B zur Stimulation der PLC- $\epsilon$ , wodurch nachfolgend die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration gesteigert wird. Die endgültige Aktivierung von H-Ras und darüber die der MAP-Kinasen wird durch ein  $\text{Ca}^{2+}$ -reguliertes Ras-GEF, möglicherweise RasGRP1, katalysiert. Vergleicht man die hier beschriebenen Daten hinsichtlich der Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2 durch  $G_s$ -gekoppelte Rezeptoren mit den zuvor veröffentlichten Befunden anderer



Arbeitsgruppen, wird ersichtlich, dass es offensichtlich eine große Vielfalt an Signaltransduktionsmöglichkeiten für diese Gruppe von Rezeptoren in verschiedenen Zelltypen, ja sogar für einen einzelnen Rezeptortyp in einer Zelllinie gibt. Die spezifischen Unterschiede, die zu dieser differentiellen Verschaltung einzelner Signalmoleküle führen, bedürfen weiterer Untersuchungen.

## 6. Zusammenfassung

Ein wesentlicher Signalweg vieler G-Protein-gekoppelter Rezeptoren ist die Aktivierung von Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen) der ERK-Familie (ERK1 und ERK2, *extracellular signal-regulated kinase*), wodurch nachfolgend u.a. durch Regulation von Transkriptionsfaktoren Zellwachstum und -differenzierung entscheidend beeinflusst werden.  $G_s$ -gekoppelte Rezeptoren, die über Stimulation der Adenylylcyclase (AC) die Bildung des *second messenger* cAMP steigern, können diesen Signalweg ganz unterschiedlich regulieren. Während diese Rezeptoren in vielen Zellen die ERK-Aktivierung hemmen, induzieren sie diesen Signalweg in anderen, insbesondere in neuronalen und endokrinen Zellen. Beide Prozesse, Hemmung und Aktivierung der MAP-Kinasen, scheinen im wesentlichen über die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA) vermittelt zu werden.

Die Mechanismen der ERK-Aktivierung durch  $G_s$ -gekoppelte Rezeptoren wurden in den letzten Jahren intensiv untersucht. Dabei wurden, im wesentlichen durch Untersuchungen am  $\beta_2$ -Adrenozeptor ( $\beta_2$ -AR) in HEK-293-Zellen, zwei unterschiedliche Modelle erarbeitet. Nach dem einem Modell erfolgt die Aktivierung der MAP-Kinasen durch den  $\beta_2$ -AR dadurch, dass er nach Phosphorylierung durch die PKA zur Aktivierung von  $G_i$ -Proteinen führt, wodurch  $G\beta\gamma$ -Dimere freigesetzt werden, die dann über die zytosolische Tyrosinkinase c-Src zur Aktivierung von Ras als Trigger der MAP-Kinasen-Kaskade führen. Nach dem anderen Modell wird c-Src direkt durch die PKA phosphoryliert und führt dann zur Aktivierung von Rap1, einer Ras-verwandten GTPase, die dann die ERK-Aktivierung initiiert. In jüngster Zeit gab es jedoch mehrere Berichte, dass  $G_s$ -gekoppelte Rezeptoren die MAP-Kinasen auch unabhängig von der PKA aktivieren können. Unsere Arbeitsgruppe hat kürzlich einen neuen Signalweg für  $G_s$ -gekoppelte Rezeptoren beschrieben, nämlich eine Stimulation der Phospholipase C- $\epsilon$  (PLC- $\epsilon$ ) mit nachfolgender Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ). Diese Zellantwort, die für den in HEK-293-Zellen exprimierten  $\beta_2$ -AR und für den in N1E-115-Neuroblastomzellen endogen exprimierten Rezeptor für das Prostanoid Prostaglandin  $E_1$  ( $PGE_1$ ) dargestellt wurde, benötigte nicht die PKA, sondern wurde durch die direkt durch cAMP aktivierten Epac-Proteine, spezifische Gunaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) für Rap-GTPasen, und die GTPase Rap2B vermittelt. Ziel der vorliegenden Arbeit war zu

untersuchen, ob dieser neue Signalweg  $G_s$ -gekoppelter Rezeptoren zur Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 (ERK1/2) beiträgt und, wenn ja, welche molekularen Mechanismen hierbei beteiligt sind, insbesondere ob die PLC- $\epsilon$  über ihre Lipaseaktivität oder ihre GEF-Aktivität für Ras/Rap-GTPasen, die in ihrer CDC25-Domäne lokalisiert ist, diesen Signalweg steuert.

Die Untersuchungen erfolgten primär in HEK-293-Zellen, die transient den  $\beta_2$ -AR exprimierten. Eine Stimulation des Rezeptors mit dem Agonisten Adrenalin führte zu einer zeit- und konzentrationsabhängigen Aktivierung von ERK1/2, die durch den  $\beta$ -AR-Antagonisten Propranolol und die MAP-Kinase-Kinase-Inhibitoren PD98059 und U0126 unterdrückt wurde. Die stimulatorischen Effekte von Adrenalin wurden durch den direkten AC-Aktivator Forskolin imitiert und durch den direkten AC-Inhibitor 2',5'-Didesoxyadenosin unterdrückt, was zeigte, dass die durch den  $\beta_2$ -AR induzierte ERK-Aktivierung von der Bildung von cAMP abhängig ist. Weitergehende Untersuchungen mit verschiedenen Hemmstoffen und Toxinen sowie mit Expression von dominant negativen oder sequestrierenden Proteinmutanten ergaben, dass die durch den  $\beta_2$ -AR induzierte ERK-Aktivierung weder PKA, c-Src,  $G_i$ -Proteine oder aus ihnen freigesetzte  $G\beta\gamma$ -Dimere noch die GTPase Rap1A benötigte, aber von der GTPase H-Ras abhängig war, die durch den Rezeptor aktiviert wurde.

Wegen der PKA-Unabhängigkeit wurde deshalb geprüft, ob cAMP-aktivierte Epac-Proteine in die Aktivierung von H-Ras und ERK1/2 eingeschaltet sind. In der Tat führte eine direkte und spezifische Aktivierung von endogen exprimierten Epac-Proteinen (Epac1 und Epac2) durch das cAMP-Analog 8-(4-Chlorophenylthio)-2'-O-Methyl-cAMP, ähnlich wie der  $\beta_2$ -AR-Agonist Adrenalin, zu einer Aktivierung von H-Ras und einer H-Ras-abhängigen ERK-Aktivierung. Weiterhin wird gezeigt, dass die durch Adrenalin induzierte Aktivierung von H-Ras und ERK1/2 durch Expression einer cAMP-Bindungs-defizienten Epac1-Mutante oder durch Expression des RapGTPase-aktivierenden Proteins (RapGAP) II nahezu komplett unterdrückt wird, was den Schluss zuließ, dass der vom  $\beta_2$ -AR ausgehende Signalweg über Epac-Proteine und eine durch sie aktivierte Rap-GTPase, jedoch nicht Rap1A vermittelt wird. Nachfolgende Untersuchungen mit dominant negativen und konstitutiv aktiven Rap2B-Mutanten und zur Aktivierung dieser Rap-GTPase ergaben, dass die durch den  $\beta_2$ -AR induzierte und Epac-abhängige Aktivierung von H-Ras und ERK1/2 von Rap2B abhängig ist.

Wie eingangs erwähnt, führt die Epac-abhängige Aktivierung von Rap2B durch den  $\beta_2$ -AR zu einer Stimulation der PLC- $\epsilon$  mit nachfolgender  $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung. Diese Rezeptorwirkungen wurden durch Expression der cAMP-Bindungs-defizienten Epac1-Mutante und von RapGAPII gehemmt, während das Epac-spezifische cAMP-Analog rezeptorunabhängig zu einer Stimulation von PLC- und  $Ca^{2+}$ -Signalen führte. In der Folge wurde deshalb geprüft, ob und über welche Aktivität die PLC- $\epsilon$  in die Aktivierung von H-Ras und ERK1/2 durch den  $\beta_2$ -AR eingeschaltet ist. Eine Überexpression von Wildtyp-PLC- $\epsilon$ , nicht jedoch von PLC- $\beta_1$  oder PLC- $\delta_1$ , verstärkte die Aktivierung von H-Ras und ERK1/2 durch den  $\beta_2$ -AR. Wie eingangs erwähnt, weist die PLC- $\epsilon$  zwei Enzymaktivitäten auf, nämlich die Lipaseaktivität in den PLC-spezifischen X/Y-Domänen sowie eine GEF-Aktivität für Ras/Rap-GTPasen, die in der N-terminalen CDC25-Domäne lokalisiert ist. Um die Rolle der GEF-Aktivität der PLC- $\epsilon$  für die H-Ras- und ERK-Aktivierung durch den  $\beta_2$ -AR zu untersuchen, wurde eine PLC- $\epsilon$ -Mutante hergestellt, in der die CDC25-Domäne deletiert ist. Diese Mutante war in ihrer Lipaseaktivität nicht beeinträchtigt. Expression dieser PLC- $\epsilon$ -Mutante steigerte, ähnlich wie Überexpression von Wildtyp-PLC- $\epsilon$ , die Aktivierung von H-Ras und ERK1/2 durch  $\beta_2$ -AR. Dagegen wurden diese Rezeptorkwirkungen durch eine Lipase-inaktive PLC- $\epsilon$ -Mutante unterdrückt. Die CDC25-Domäne der PLC- $\epsilon$  ist somit nicht das GEF, welches die Aktivierung von H-Ras durch den  $\beta_2$ -AR vermittelt und schließlich in die Aktivierung des ERK-Signalweges mündet, sondern für diese Rezeptorwirkungen wird die Lipaseaktivität der PLC- $\epsilon$  benötigt.

Durch Stimulation der PLC- $\epsilon$  wird der zelluläre Gehalt der *second messenger* Inositol-1,4,5-trisphosphat ( $IP_3$ ) und darüber der von  $Ca^{2+}$  sowie von Diacylglycerol (DAG) gesteigert. Während die Aktivierung von H-Ras und ERK1/2 durch den  $\beta_2$ -AR durch pharmakologische Hemmung DAG-sensitiver Proteinkinase C-Isoformen nicht verändert wurde, wurden diese Rezeptorwirkungen durch Chelierung von intrazellulärem  $Ca^{2+}$  unterdrückt. Zwei Gruppen der Ras-spezifischen GEFs werden durch  $Ca^{2+}$  (RasGRP1-4) bzw.  $Ca^{2+}$ /Calmodulin (RasGRF1/2) reguliert. Die Aktivierung von H-Ras und ERK1/2 durch den  $\beta_2$ -AR wurde durch Calmodulin-Antagonisten (W7, Fluphenazin, Calmodazolium) nicht verändert. Dagegen wurden diese Rezeptorwirkungen durch Überexpression von RasGRP1 drastisch gesteigert, während RasGRP2 und RasGRP3 die Zellantworten kaum bzw. nicht veränderten.

Diese Daten zeigten, dass eine Stimulation des  $G_s$ -gekoppelten  $\beta_2$ -ARs in HEK-293-Zellen über cAMP-aktivierte Epac-Proteine und die GTPase Rap2B zur Stimulation der PLC- $\epsilon$  führt, die über die Bildung von  $IP_3$  die Freisetzung von  $Ca^{2+}$  aus intrazellulären Speichern induziert, was dann, wahrscheinlich unter Beteiligung des  $Ca^{2+}$ -regulierten Ras-GEFs RasGRP1, zur Aktivierung von H-Ras als Trigger der MAP-Kinasen-Kaskade führt. Dieser neue Signalweg konnte für den endogen in N1E-115-Neuroblastomzellen exprimierten Rezeptor für  $PGE_1$  in den relevanten Punkten verifiziert werden. Eine Stimulation des  $PGE_1$ -Rezeptors induzierte unabhängig von der PKA die Aktivierung von H-Ras und eine H-Ras-abhängige Aktivierung von ERK1/2. Diese Rezeptorwirkungen wurden durch direkte Aktivierung endogen exprimierter Epac-Proteine durch das Epac-spezifische cAMP-Analog imitiert und durch Chelierung von intrazellulärem  $Ca^{2+}$ , jedoch nicht durch Calmodulin-Hemmung unterdrückt. Insgesamt konnte mit diesen Untersuchungen also ein neuer Signalweg von  $G_s$ -gekoppelten Rezeptoren zur Aktivierung von H-Ras mit nachfolgender Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 etabliert werden. Dieser Signalweg, der für zwei unterschiedlichen Rezeptoren in zwei Zelltypen nachgewiesen wurde, unterscheidet sich von den etablierten Modellen im wesentlichen dadurch, dass das nach Rezeptorstimulation vermehrt gebildete cAMP nicht über die PKA, sondern über Epac-Proteine wirkt, die dann unter Einschaltung von Rap2B-aktivierter PLC- $\epsilon$  über ein  $Ca^{2+}$ -reguliertes GEF H-Ras und damit die MAP-Kinasen aktivieren.

## 7. Literaturverzeichnis

- Alavarez, J., Montero, M. & Garcia-Sancho, J. (1991):** Cytochrome P-450 may link  $\text{Ca}^{2+}$  stores with plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  influx. *Biochem. J.* **274**, 193-197.
- Amano, T., Richelson, E. & Nirenberg, M. (1972):** Neurotransmitter synthesis by neuroblastoma clones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 258-263.
- Asubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. & Struhl, K. (1989):** Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, N.Y.
- Baillie, G.S., Sood, A., McPhee, I., Gall, I., Perry, S.J., Lefkowitz, R.J. & Houslay, M.D. (2003):**  $\beta$ -Arrestin-mediated PDE4 cAMP phosphodiesterase recruitment regulates  $\beta$ -adrenoceptor switching from  $G_s$  to  $G_i$ . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 940-945.
- Beavo, J.A. & Brunton, L.L. (2002):** Cyclic nucleotide reasearch – still expanding after half a century. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **3**, 710-718.
- Bernards, A. & Settleman, J. (2004):** GAP control: regulating the regulators of small GTPases. *Trends Cell Biol.* **14**, 377-385.
- Berridge, M.J., Lipp, P. & Bootman, M.D. (2000):** The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **1**, 11-21.
- Berridge, M.J., Bootman, M.D. & Roderick, H.L. (2003):** Calcium signalling: dynamic, homeostasis and remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **4**, 517-529.
- Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979):** A rapid and alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**, 1513.
- Bos, J.L., de Rooij, J. & Reedquist, K.A. (2001):** Rap1 signalling: adhering to new models. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2**, 369-377.
- Bos, J.L. (2003):** Epac: a new cAMP target and new avenues in cAMP research. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **4**, 733-738.
- Bradford, M.M. (1976):** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Chen, C., Koh, A.J., Datta, N.S., Zhang, J., Keller, E.T., Xiao, G., Franceschi, R.T., D'Silva, N.J & McCauley, L.M. (2004):** Impact of the mitogen-activated protein kinase pathway on parathyroid hormone-related protein actions in osteoblasts. *J. Biol. Chem.* **279**, 29121-29129.

- Chijiwa, T., Mishima, A., Hagiwara, M., Sano, M., Hayashi, K., Inoue, T., Naito, K., Toshioka, T. & Hidaka, H. (1990):** Inhibition of forskolin-induced neurite outgrowth and protein phosphorylation by a newly synthesized selective inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase, N-[2-(p-bromocinamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H-89). *J. Biol. Chem.* **265**, 5267-5272.
- Christensen, A.E., Selheim, F., de Rooij, J., Dremier, S., Schwede, F., Dao, K.K., Martinez, A., Maenhaut, C., Bos, J.L., Genieser, H.-G. & Døskeland, S.O. (2003):** cAMP analog mapping of Epac1 and cAMP kinase. Discriminating analogs demonstrate that Epac and cAMP kinase act synergistically to promote PC12- cell neurite extension. *J. Biol. Chem.* **278**, 35394-35402.
- Cullen, P.J. (2001):** Ras effectors: buying shares in Ras plc. *Curr. Biol.* **11**, R342-R344.
- Cullen, P.J. & Lockyer, P.J. (2002):** Integration of calcium and Ras signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **3**, 339-348.
- Daaka, Y., Luttrell, L.M. & Lefkowitz, R.J. (1997):** Switching of the coupling of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature* **390**, 88-91.
- de Bruyn, K.M., Rangarajan, S., Reedquist, K.A., Figdor, C.G. & Bos, J.L. (2002):** The small GTPase Rap1 is required for  $Mn^{2+}$ - and antibody-induced LFA-1- and VLA-4-mediated cell adhesion. *J. Biol. Chem.* **277**, 29468-29476.
- de Rooij, J., Zwartkruis, F.J., Verheijen, M.H., Cool, R.H., Nijman, S.M., Wittinghofer, A. & Bos, J.L. (1998):** Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* **396**, 474-477.
- Dykxhoorn, D.M., Novina, C.D. & Sharp, P.A. (2003):** Killing the messenger: Short RNAs that silence gene expression. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **4**, 457-467.
- Ebinu, J.O., Bottorff, D.A., Chan, E.Y.W., Stang, S.L., Dunn, R.J. & Stone, J.C. (1998):** RasGRP, a Ras guanyl nucleotide-releasing protein with calcium- and diacylglycerol-binding motifs. *Science* **280**, 1082-1086.
- English, J.M. & Cobb, M.H. (2002):** Pharmacological inhibitors of MAPK pathways. *Trends Pharmacol. Sci.* **23**, 40-45.
- Enserink, J.M., Christensen, A.E., de Rooij, J., van Triest, M., Schwede, F., Genieser, H.G., Døskeland, S.O., Blank, J.L. & Bos, J.L. (2003):** A novel Epac-specific cAMP analogue demonstrates independent regulation of Rap1 and ERK. *Nat. Cell Biol.* **4**, 901-906.

- Etienne-Manneville, S. & Hall, A. (2002):** Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**, 629-635.
- Evellin, S., Nolte, J., Tysack, K., vom Dorp, F., Thiel, M., Oude Weernink, P.A., Jakobs, K.H., Webb, E.J., Lomasney, J.W. & Schmidt, M. (2002):** Stimulation of phospholipase C- $\epsilon$  by the M<sub>3</sub> muscarinic acetylcholine receptor mediated by cyclic AMP and the GTPase Rap2B. *J. Biol. Chem.* **277**, 16805-16813.
- Franke, B., Akkerman, J.W. & Bos, J.L. (1997):** Rapid Ca<sup>2+</sup>-mediated activation of Rap1 in human platelets. *EMBO J.* **16**, 252-259.
- Fujita, T., Meguro, .T, Fukuyama, R., Nakamuta, H. & Koida, M. (2002):** New signaling pathway for parathyroid hormone and cyclic AMP action on extracellular-regulated kinase and cell proliferation in bone cells. Checkpoint of modulation by cyclic AMP. *J. Biol. Chem.* **277**, 22191-22200.
- Gietzen, K. (1983):** Comparison of the calmodulin antagonists compound 48/80 and calmidazolium. *Biochem. J.* **216**, 611-616.
- Gjertsen, B.T., Mellgren, G., Otten, A., Maronde, E., Genieser, H.-G., Jastorff, B., Vintermyr, O.K., McKnight, G.S. & Døskelands, S.O. (1995):** Novel (Rp)-cAMPS analogs as tools for inhibition of cAMP-kinase in cell culture. Basal cAMP-kinase activity modulates interleukin-1 $\beta$  action. *J. Biol. Chem.* **270**, 20599-20607.
- Gutkind, J.S. (1998):** Cell growth control by G protein-coupled receptors: from signal transduction to signal integration. *Oncogene* **17**, 1331-1342.
- Gutkind, J.S. (2000):** Regulation of mitogen-activated protein kinase signalling networks by G protein-coupled receptors. *Science's STKE* [http://www.stke.org/cgi/content/full/OC\\_sigtrams;2000/40/re1](http://www.stke.org/cgi/content/full/OC_sigtrams;2000/40/re1)
- Hall, A. (2000):** GTPases. University press, Oxford.
- Hanoune, J. & Defer, N. (2001):** Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **41**, 145-174.
- Hanke, J.H., Gardner, J.P., Dow, R.L., Changelian, P.S., Brissette, W.H., Weringer, E.J., Pollok, B.A. & Connelly, P.A. (1996):** Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. Study of Lck- and Fynt-dependent T cell activation. *J. Biol. Chem.* **271**, 695-701.
- Holz, G.G. (2004):** Epac: A new cAMP-binding protein in support of glucagons-like peptide receptor-mediated signal transduction in the pancreatic  $\beta$ -cell. *Diabetes* **53**, 5-13.
- Iacovelli, L., Capobianco, L., D'Ancona, G.M., Picascia, A. & De Blasi, A. (2001):** Thyrotropin activates mitogen-activated protein kinase pathway in



- FRTL-5 by a cAMP-dependent protein kinase A-independent mechanism. *Mol. Pharmacol.* **60**, 924-933.
- Itoh, H. & Hidaka, H. (1984):** Direct interaction of calmodulin antagonists with  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase. *J. Biochem.* **96**, 1721-1726.
- Jin, T.G., Satoh, T., Liao, Y., Song, C., Gao, X., Kariya, K., Hu, C.D. & Kataoka, T. (2001):** Role of the CDC25 homology domain of phospholipase C- $\epsilon$  in amplification of Rap1-dependent signaling. *J. Biol. Chem.* **276**, 30301-30307.
- Johnson, G.L. & Lapadat, R. (2002):** Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* **286**, 1911-1912.
- Kawasaki, H., Springett, G.M., Mochizuki, N., Toki, S., Nakaya, M., Matsuda, M., Housman, D.E. & Graybiel, A.M. (1998):** A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science* **282**, 2275-2279.
- Keiper, M., Stope, M.B., Szatkowski, D., Böhm, A., Tysack, K., Vom Dorp, F., Saur, O., Oude Weernink, P.A., Evellin, S., Jakobs, K.H. & Schmidt, M. (2004):** Epac- and  $\text{Ca}^{2+}$ -controlled activation of Ras and extracellular signal-regulated kinases by  $\text{G}_s$ -coupled receptors. Involvement of Rap2B-activated phospholipase C- $\epsilon$ . *J. Biol. Chem.* **279**, 46497-46508.
- Kelley, G.G., Reks, S.E., Ondrako, J.M. & Smrcka, A.V. (2001):** Phospholipase C $\epsilon$ : a novel Ras effector. *EMBO J.* **20**, 743-754.
- Kelley, G.G., Reks, S.E. & Smrcka, A.V. (2004):** Hormonal regulation of phospholipase C $\epsilon$  through distinct and overlapping pathways involving G12 and Ras family G-proteins. *Biochem. J.* **15**, 129-139.
- Kinbara, K., Goldfinger, L.E., Hansen, M., Chou, F.L. & Ginsberg, M.H. (2003):** Ras GTPases: integrins' friends or foes? *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **4**, 767-776.
- Koch, W.J., Hawes, B.E., Inglese, J., Luttrell, L.M. & Lefkowitz, R.J. (1994):** Cellular expression of the carboxyl terminus of a G protein-coupled receptor kinase attenuates  $\text{G}\beta\gamma$ -mediated signalling. *J. Biol. Chem.* **269**, 6193-6197.
- Laemmli, U. (1970):** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Laroche-Joubert, N., Marsy, S., Michelet, S., Imbert-Teboul, M. & Doucet, A. (2002):** Protein kinase A-independent activation of ERK and H,K-ATPase by cAMP in native kidney cells. Role of Epac I. *J. Biol. Chem.* **277**, 18598-18604.
- Lefkowitz, R.J. (2000):** The superfamily of heptahelical receptors. *Nat. Cell Biol.* **2**, E133-E136.

- Lefkowitz, R.J., Pierce, K.L. & Luttrell, L.M. (2002):** Dancing with different partners: protein kinase A phosphorylation of seven membrane-spanning receptors regulates their G protein-coupling specificity. *Mol. Pharmacol.* **62**, 971-974.
- Lin, S.L., Johnson-Farley, N.N., Lubinsky, D.R. & Cowen, D.S. (2004):** Coupling of neuronal 5-HT<sub>7</sub> receptors to activation of extracellular-regulated kinase through a protein kinase A-independent pathway that can utilize Epac. *J. Neurochem.* **87**, 1076-1085.
- Lopez, I., Mak, E.C., Ding, J., Hamm, H.E. & Lomasney, J.W. (2001):** A novel bifunctional phospholipase C that is regulated by G $\alpha_{12}$  and stimulates the Ras/mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Biol. Chem.* **276**, 2758-2765.
- Lorenzo, P.S., Kung, J.W., Bottorff, D.A., Garfield, S.H., Stone, J.C. & Blumberg, P.M. (2001):** Phorbol esters modulate the Ras exchange factor RasGRP3. *Cancer Res.* **61**, 943-949.
- Marinissen, M.J. & Gutkind, J.S. (2001):** G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol. Sci.* **22**, 368-376.
- Meinecke, M., Geiger, J., Butt, E., Sandberg, M., Jahnsen, T., Chakraborty, T., Walter, U., Jarchau, T. & Lohmann, S.M. (1994):** Human cyclic GMP-dependent protein kinase I $\beta$  overexpression increases phosphorylation of an endogenous focal contact-associated vasodilator-stimulated phosphoprotein without altering the thrombin-evoked calcium response. *Mol. Pharmacol.* **46**, 283-290.
- Meyer zu Heringdorf, D., Vincent, M.E., Lipinski, M., Danneberg, K., Stropp, U., Tigyi, G. & Jakobs, K.H. (2003):** Inhibition of Ca<sup>2+</sup> signalling by the sphingosine 1-phosphate receptor S1P<sub>1</sub>. *Cell. Signal.* **15**, 677-687.
- Morrison, D.K. (2004):** Enzymes play molecular tag. *Nature* **428**, 813-814.
- Murphy, G.A., Graham, S.M., Morita, S., Reks, S.E., Rogers-Graham, K., Vojtek, A., Kelley, G.G. & Der, C.J. (2002):** Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase, but not RalGDS, in TC21/R-Ras2-mediated transformation. *J. Biol. Chem.* **277**, 9966-9975.
- Newton, A.C. (2001):** Protein kinase C: Structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chem. Rev.* **101**, 2353-2364.
- Ohba, Y., Kurokawa, K. & Matsuda, M. (2003):** Mechanism of the spatio-temporal regulation of Ras and Rap1. *EMBO J.* **22**, 859-869.

- Ostrom, R.S. & Insel, P.A. (2004):** The evolving role of lipid rafts and caveolae in G protein-coupled receptor signalling: implications for molecular pharmacology. *Brit. J. Pharmacol.* **143**, 235-245.
- Ozaki, N., Shibasaki, T., Kashima, Y., Miki, T., Takahashi, K., Ueno, H., Sunaga, Y., Yano, H., Matsuura, Y., Iwanaga, T., Takai, Y. & Seino, S. (2000):** cAMP-GEFII is a direct target of cAMP in regulated exocytosis. *Nat. Cell Biol.* **2**, 805-811.
- Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B.E., Karandikar, M., Berman, K. & Cobb, M.H. (2001):** Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr. Rev.* **22**, 153-183.
- Peralta, E.G., Ashkenazi, A., Winslow, J.W., Ramachandran, J. & Capon, D.J. (1988):** Differential regulation of PI hydrolysis and adenyl cyclase by muscarinic receptor subtypes. *Nature* **334**, 434-437.
- Qiao, J., Mei, F.C., Popov, V., Vergara, L.A. & Cheng, X. (2002):** Cell cycle-dependent subcellular localization of exchange factor directly activated by cAMP. *J. Biol. Chem.* **277**, 26581-26586.
- Quilliam, L.A., Rebhuhn, J.F. & Castro, A.F. (2002):** A growing family of guanine nucleotide exchange factors is responsible for activation of Ras-family GTPases. *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* **71**, 391-444.
- Rehmann, H., Prakash, B., Wolf, E., Rueppel, A., de Rooij, J., Bos, J.H. & Wittinghofer, A. (2003a):** Structure and regulation of the cAMP-binding domains of Epac2. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 26-32.
- Rehmann, H., Rueppel, A., Bos, J.L. & Wittinghofer, A. (2003b):** Communication between the regulatory and the catalytic region of the cAMP-responsive guanine nucleotide exchange factor Epac. *J. Biol. Chem.* **278**, 23508-23514.
- Rhee, S.G. (2001):** Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 281-312.
- Richards, J.S. (2001):** New signalling pathways for hormones and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate action in endocrine cells. *Mol. Endocrinol.* **15**, 209-218.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989):** Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, N.Y.
- Sambrook, J. & Russell, D.W. (2001):** Molecular Cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, N.Y.

- Saunders, C.M., Larman, M.G., Parrington, J., Cox, L.J., Royse, J., Blayney, L.M., Swann, K. & Lai, F.A. (2002):** PLC $\zeta$ : a sperm- specific trigger of Ca<sup>2+</sup> oscillations in eggs and embryo development. *Development* **129**, 3533-3544.
- Schlessinger, J. (2000):** Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **103**, 211-225.
- Schmidt, A. & Hall, A. (2002):** Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Develop.* **16**, 1587-1609.
- Schmidt, M., Hüwe, S.M., Fasselt, B., Homann, D., Rümenapp, U., Sandmann, J. & Jakobs, K.H. (1994):** Mechanisms of phospholipase D stimulation by m3 muscarinic acetylcholine receptors. Evidence for involvement of tyrosine phosphorylation. *Eur. J. Biochem.* **225**, 667-675.
- Schmidt, M., Frings, M., Mono, M.L., Guo, Y., Oude Weernink, P.A., Evellin, S., Han, L. & Jakobs, K.H. (2000):** G protein-coupled receptor-induced sensitization of phospholipase C stimulation by receptor tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* **275**, 32603-32610.
- Schmidt, M., Evellin, S., Oude Weernink, P.A., von Dorp, F., Rehmann, H., Lomasney, J.W. & Jakobs, K.H. (2001):** A new phospholipase-C-calcium signalling pathway mediated by cyclic AMP and a Rap GTPase. *Nat. Cell Biol.* **3**, 1020-1024.
- Schmidt, M., Oude Weernink, P.A., vom Dorp, F., Stope, M.B. & Jakobs, K.H. (2004):** Mammalian phospholipase C. *Advances in Molecular and Cell Biology* (van der Vusse GJ ed), Vol. 33 Lipobiology, pp. 433-453, Elsevier Science, Amsterdam.
- Schmitt, J.M. & Stork, P.J.S. (2000):**  $\beta_2$ -Adrenergic receptor activates extracellular signal-regulated kinases (ERKs) via the small G protein Rap1 and the serine/threonine kinase B-Raf. *J. Biol. Chem.* **275**, 25432-25350.
- Schmitt, J.M. & Stork, P.J.S. (2002a):** G $\alpha$  und G $\beta\gamma$  require distinct Src-dependent pathways to activate Rap1 and Ras. *J. Biol. Chem.* **277**, 43024-43032.
- Schmitt, J.M. & Stork, P.J.S. (2002b):** PKA phosphorylation of Src mediates cAMP's inhibition of cell growth by Rap1. *Mol. Cell* **9**, 85-94.
- Schmitz, A.A., Govek, E.E., Bottner, B. & Van Aelst, L. (2000):** RhoGTPases: signaling, migration, and invasion. *Exp. Cell Res.* **261**, 1-12.
- Schwarz, U.R., Walter, U. & Eigenthaler, M. (2001):** Taming platelets with cyclic nucleotides. *Biochem. Pharmacol.* **62**, 1153-1161.

- Seifert, J.P., Wing, M.R., Snyder, J.T., Gershburg, S., Sondek, J. & Harden, T.K. (2004):** RhoA activates purified phospholipase C- $\epsilon$  by a guanine nucleotide-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* **279**, 47992-47997.
- Shibatoghe, M., Kariya, K., Liao, Y., Hu, C.-D., Watari, Y., Goshima, M., Shima, F. & Kataoka, T. (1998):** Identification of PLC210, a *Caenorhabditis elegans* phospholipase C, as a putative effector of Ras. *J. Biol. Chem.*, **273**, 6218-6222.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. & Klenk, D.C. (1985):** Measurement of protein using bicinchonic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76-85.
- Song, C., Hu, C.D., Masago, M., Kariyai, K., Yamawaki-Kataoka, Y., Shibatohe, M., Wu, D., Satoh, T. & Kataoka, T. (2001):** Regulation of a novel human phospholipase C, PLC $\epsilon$ , through membrane targeting by Ras. *J. Biol. Chem.* **276**, 2752-2757.
- Song, C., Satoh, T., Edamatsu, H., Wu, D., Tadano, M., Gao, X. & Kataoka, T. (2002):** Differential roles of Ras and Rap1 in growth factor-dependent activation of phospholipase C- $\epsilon$ . *Oncogene* **21**, 8105-8113.
- Springett, G.M., Kawasaki, H. & Spriggs, D.R. (2004):** Non-kinase second-messenger signaling: new pathways with new promise. *Bioessays* **26**, 730-738.
- Stope, M.B., vom Dorp, F., Szatkowski, D., Böhm, A., Keiper, M., Nolte, J., Oude Weernink, P.A., Rosskopf, D., Evellin, S., Jakobs, K.H. & Schmidt, M. (2004):** Rap2B-dependent stimulation of phospholipase C- $\epsilon$  by epidermal growth factor receptor mediated by c-Src phosphorylation of RasGRP3. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 4664-4676.
- Stork, P.J.S. & Schmitt, M. (2002):** Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in the regulation of cell proliferation. *Trends Cell Biol.* **12**, 258-266.
- Takai, Y., Sasaki, T. & Matozaki, T. (2001):** Small GTP-binding proteins. *Physiol. Rev.* **81**, 153-208.
- Tian, X., Gotoh, T., Tsuji, K., Lo, E.H., Huang, S. & Feig, L.A. (2004):** Developmentally regulated role for Ras-GRFs in coupling NMDA glutamate receptors to Ras, Erk and CREB. *EMBO J.* **23**, 1567-1575.
- Towbin, H. Stadelin, T. & Gordon, J. (1979):** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedures and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354.

- vom Dorp, F., Sari, A.Y., Sanders, H., Keiper, M., Oude Weernink, P.A., Jakobs, K.H. & Schmidt, M. (2004): Inhibition of phospholipase C- $\epsilon$  by G $_i$ -coupled receptors. *Cell. Signal.* **16**, 921-928.
- Voß, M., Oude Weernink, P. A., Hauptenthal, S., Möller, U., Cool, R.H., Bauer, B., Camonis, J.H., Jakobs, K.H. & Schmidt, M. (1999): Phospholipase D stimulation by receptor tyrosine kinases mediated by protein kinase C and a Ras/Ral signaling cascade. *J. Biol. Chem.* **274**, 34691-34698.
- Walker, S.A., Cullen ,P.J., Taylor, J.A. & Lockyer, P.J. (2003): Control of Ras cycling by Ca<sup>2+</sup>. *FEBS Lett.* **546**, 6-10.
- Walker, S.A., Kpzig, S., Bouyoucet, D., Davies, L.C., Tsuboi, T., Bivona, T.G., Cozier, G.E., Lockyer, P.J., Buckler, A., Rutter, G.A., Allen, M.J., Philips, M.R. & Cullen ,P.J. (2004): Identification of a Ras GTPase-activating protein regulated by receptor-mediated Ca<sup>2+</sup> oscillations. *EMBO J.* **23**, 1749-1760.
- Wan, P.T., Garnett, M.J., Roe, S.M., Lee, S., Niculescu-Duvaz, D., Good, V.M., Jones, C.M., Marshall, C.J., Springer, C.J., Barford, D. & Marais, R. (2004): Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* **19**, 855-867.
- Wing, M.R., Houston, D., Kelley, G.G., Der, C.J., Siderovski, D.P. & Harden, T.K. (2001): Activation of phospholipase C- $\epsilon$  by heterotrimeric G protein  $\beta\gamma$ -subunits. *J. Biol. Chem.* **276**, 48257-48261.
- Wing, M.R., Snyder, J.T. & Harden, T.K. (2003): Direct activation of phospholipase C- $\epsilon$  by Rho. *J. Biol. Chem.* **278**, 41253-41258.
- Wing, M.R., Bourdon, D.M. & Harden, T.K. (2003): PLC- $\epsilon$ : A shared effector protein in Ras-, Rho-, G $\alpha\beta\gamma$ -mediated signaling. *Mol. Interactions* **3**, 273-280.
- Yang, Y., Li, L., Wong, G.W., Krilis, S.A., Madhusudhan, M.S., Šali, A. & Stevens, R.L. (2002): RasGRP4, a new mast cell-restricted Ras guanine nucleotide-releasing protein with calcium- and diacylglycerol-binding motifs. *J. Biol. Chem.* **277**, 25756-25774.
- Zaccolo, M., Magalhaes, P. & Pozzan, T. (2002): Compartmentalisation of cAMP and Ca<sup>2+</sup> signals. *Curr. Opin. Cell Biol.* **14**, 160-166.

## 8. Anhang

### Während der Anfertigung der Promotion entstandene Publikationen:

#### Originalarbeiten:

**Keiper, M., Stope, M.B., Szatkowski, D., Böhm, A., Tysack, K., vom Dorp, F., Saur, O., Oude Weernink, P.A., Evellin, S., Jakobs, K.H. & Schmidt, M. (2004):** Epac- and  $\text{Ca}^{2+}$ -controlled activation of Ras and extracellular signal-regulated kinases by  $\text{G}_s$ -coupled receptors. Involvement of Rap2B-activated phospholipase C- $\epsilon$ . *J. Biol. Chem.* **279**, 46497-46508.

**Stope, M.B., vom Dorp, F., Szatkowski, D., Böhm, A., Keiper, M., Nolte, J., Oude Weernink, P.A., Rosskopf, D., Evellin, S., Jakobs, K.H. & Schmidt, M. (2004):** Rap2B-dependent stimulation of phospholipase C- $\epsilon$  by epidermal growth factor receptor mediated by c-Src phosphorylation of RasGRP3. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 4664-4676.

**vom Dorp, F., Sari, A.Y., Sanders, H., Keiper, M., Oude Weernink, P.A., Jakobs, K.H. & Schmidt, M. (2004):** Inhibition of phospholipase C- $\epsilon$  by  $\text{G}_i$ -coupled receptors. *Cell. Signal.* **16**, 921-928.

#### Abstracts von Vortrags- und Posterpräsentationen auf nationalen Tagungen:

**Keiper, M., Böhm, A., Evellin, S., vom Dorp, F., Oude Weernink, P.A., Jakobs, K.H. & Schmidt, M. (2003):** Phospholipase C- $\epsilon$ -mediated stimulation of mitogen-activated protein kinases by the  $\beta_2$ -adrenoceptor. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **367**, R50.

**Schmidt, M., Keiper, M., Böhm, A., Evellin, S., Sari, A., Szatkowski, D., vom Dorp, F., Oude Weernink, P.A. & Jakobs, K.H. (2003):** Mechanisms of the CalDAG3- and Rap2B-mediated phospholipase C- $\epsilon$  stimulation by the

epidermal growth factor receptor. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **367**, R52.

**Keiper, M., Böhm, A. & Schmidt, M. (2003):** Rolle der Phospholipase C- $\epsilon$  bei der MAP-Kinase Stimulation über den  $\beta_2$ -Adrenozeptor. *Posterpräsentation am 2. Forschungstag des Universitätsklinikums Essen.*

**Szatkowski, D., Keiper, M., Stope, M.B., Oude Weernink, P.A., Jakobs, K.H. & Schmidt, M. (2004):** PLC- $\epsilon$  and CalDAG2-mediated activation of Ras and MAP kinases by the  $\beta_2$ -adrenoceptor. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **2369**, R51.



## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Prof. Dr. K. H. Jakobs am Institut für Pharmakologie des Universitätsklinikum Essen angefertigt, bei dem ich mich für die Überlassung des Themas herzlich bedanke.

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Martina Schmidt für die engagierte Betreuung bei der Durchführung der Arbeit und die zahlreichen wissenschaftlichen Ratschläge. Herrn Dr. Matthias Stope danke ich für seine Unterstützung bei der Herstellung der Epac1- und PLC- $\epsilon$ -Mutanten.

Ich danke allen Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie, insbesondere Kirsten Baden, Helgard Geldermann, Monika Hagedorn, Doris Petermeyer, Annette Kötting-Dorsch und den medizinischen Doktoranden Anja Böhm und Daniel Szatkowski, die auf unterschiedlichste Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ganz besonders möchte ich mich an dieser Stelle bei meiner Familie und meinem Mann Tim für die Liebe, das Verständnis, die Geduld, Hilfsbereitschaft und so manches aufbauende Wort bedanken. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

Abschließend danke ich Gott für die Kraft, Geduld und Liebe, die er mir jeden Tag neu schenkt.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name:	Melanie Roswitha Leuchter, geb. Keiper
Geburtsdatum:	11. April 1975
Geburtsort:	Mannheim
Familienstand:	verheiratet
Nationalität:	deutsch

### Berufserfahrung

seit Februar 2002	wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pharmakologie, Universitätsklinikum Essen; Erstellung der Doktorarbeit
Mai 2001 – Oktober 2001	Königsapotheke – Düsseldorf
Juli 2000 – April 2001	Stadt-Apotheke – Lampertheim

### Studium

28.06.2000	Erhalt der Approbation als Apothekerin
09.06.2000	Dritte Pharmazeutischen Prüfung
November 1999 – April 2000	Turm-Apotheke Mannheim-Feudenheim (zweite Hälfte des praktischen Jahres)
Mai 1999 – Oktober 1999	AstraZeneca, Plankstadt (erste Hälfte des praktischen Jahres)
Oktober 1994 – April 1999	Studium der Pharmazie an der Ruprecht-Karls- Universität Heidelberg

### Schule

August 1985 – Juni 1994	Peter-Petersen-Gymnasium – Mannheim; Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
1981 - 1985	Grundschule – Mannheim Sandhofen

Essen, den 10.12.2004

Melanie Leuchter

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gemäß 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Ein neuer Signalweg  $G_s$ -gekoppelter Rezeptoren: Aktivierung von Ras und MAP-Kinasen durch Epac und Calcium“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Frau Leuchter befürworte.

Essen, den 10. Dezember 2004

(Prof. Dr. K. H. Jakobs)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gemäß 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den 10. Dezember 2004

(Melanie Leuchter)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gemäß 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den 10. Dezember 2004

(Melanie Leuchter)